



TITLE:

腎尿細管有機カチオン輸送系の膜流動性による制御に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

鍋倉, 智裕

CITATION:

鍋倉, 智裕. 腎尿細管有機カチオン輸送系の膜流動性による制御に関する研究. 京都大学, 1998, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1998-01-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3133215>

RIGHT:

腎尿細管有機カチオン輸送系の膜流動性による
制御に関する研究

1998

鍋 倉 智 裕

目 次

総論の部

緒言	1
第 I 章 刷子縁膜の流動性上昇による有機カチオン輸送の調節	4
I-1 有機カチオン輸送に及ぼすアルコール類の影響	5
1-a 刷子縁膜流動性に及ぼすベンジルアルコールの影響	6
1-b 有機カチオン輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響	7
1-c 有機カチオン輸送に及ぼすアルキルアルコールの影響	12
I-2 Choline 及び glucose 輸送に及ぼすアルコールの影響 : 有機カチオン輸送系との比較	14
2-a Choline 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響	14
2-b Glucose 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響	16
I-3 側底膜における有機カチオン輸送に及ぼすアルコールの影響 : 刷子縁膜との比較	18
3-a 側底膜における有機カチオン輸送に及ぼす ベンジルアルコールの影響	19
3-b 側底膜における有機アニオン輸送に及ぼす ベンジルアルコールの影響	20
I-4 考察	22
第 II 章 刷子縁膜の流動性低下による有機カチオン輸送の調節	26
II-1 刷子縁膜流動性に及ぼすコレステロールの影響	26
1-a コレステロール処理による刷子縁膜コレステロール含量の変化	27
1-b コレステロール処理による刷子縁膜流動性の変化	27
II-2 有機カチオン輸送に及ぼすコレステロールの影響	28
2-a コレステロール処理による有機カチオン輸送の変化	29
2-b コレステロール処理による glucose 輸送の変化	33
II-3 考察	34

第 III 章 膜流動性変化による有機カチオン輸送の調節：発育の影響…37

III-1 刷子縁膜流動性に及ぼす発育の影響 ……38

1-a 膜小胞の精製度の検討 ……38

1-b 哺乳ラットと成熟ラットの刷子縁膜流動性の比較 ……39

III-2 成長に伴う有機カチオン輸送の変化 ……40

2-a 哺乳ラットと成熟ラットの有機カチオン輸送特性の比較 …… 40

2-b 成長に伴う有機カチオン輸送活性の変化 ……42

III-3 考察 ……45

結論 …… 48

謝辞 …… 50

実験の部 ……51

第 I 章 実験の部 ……51

第 II 章 実験の部 …… 57

第 III 章 実験の部 …… 58

論文目録 ……60

引用文献 ……61

総論の部

緒言

生体内に投与された多くの薬物の主排泄経路は腎臓であり、未変化体薬物や代謝を受けた薬物が尿中へと排出される。従って腎臓は薬物の体内動態、さらには医薬品の薬効・毒性を考える上で極めて重要な臓器である。医薬品の持つ有効性を最大限に引き出し、かつ安全性を確保するためには、個々の薬物の腎排泄機構のみならず、患者の腎機能、腎排泄過程における薬物相互作用発現の可能性等について十分に考慮する必要がある。

腎臓は生体内恒常性を保つ上で極めて重要な臓器であり、その基本的な機能の一つとして多様な内因性及び外因性の不要物質や有害物質を体外へと排出する働きを挙げることができる。腎における薬物等異物の排泄は糸球体での濾過及び尿細管での能動的分泌により行われる。近位尿細管に有機カチオン輸送系が存在し、多くのカチオン性薬物がこの輸送系を介して能動的に分泌され、尿中へと排泄されることは個体や組織レベルで古くから知られていた⁽¹⁾。また、近年導入された膜小胞を用いる実験系により血管側側底膜及び尿細管腔側刷子縁膜という構造・機能の異なる細胞膜を介する薬物輸送機構について、膜レベルでの解析が進んできた⁽²⁻⁶⁾。さらに最近では、遺伝子工学的手法により薬物輸送を担う輸送体の実体についても明らかにされつつある。Gründemann ら⁽⁷⁾はアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニング法を用いて腎尿細管側底膜の有機カチオン輸送体をコードすると考えられる遺伝子、OCT1 を単離した。またその塩基配列から輸送体の一次構造、二次構造が推定され、側底膜の有機カチオン輸送体は膜貫通領域を有する膜内在性蛋白質であると推察された。刷子縁膜における有機カチオン輸送体をコードする遺伝子は未だ明らかにされていないが、側底膜のものと同様に膜内在性蛋白質であると予想される。遺伝子工学的手法によって薬物輸送の調節機構についても、遺伝子の転写や蛋白質への翻訳段階での変化等について分子レベルでの解明が進むことが期待される。

生体膜の重要な特徴の一つは、それが例外なく蛋白質と脂質を主成分として構成されていることであり、かつその構造が極めて流動性に富む動的な性質を持っている

ることである。生体膜の基本的な構造は、脂質二重層を基盤とする流動モザイクモデルに基づいた構造が広く受け入れられている⁽⁸⁻¹⁰⁾。このモデルの重要な概念は、膜のダイナミックな構造(流動性)の重視、及びこの流動的な膜構造が膜機能の発現と関連づけて考えられていることである。事実、多くの細胞膜機能は細胞膜の動的な構造、膜脂質環境の影響を受けることが報告されている⁽¹¹⁻¹⁶⁾。

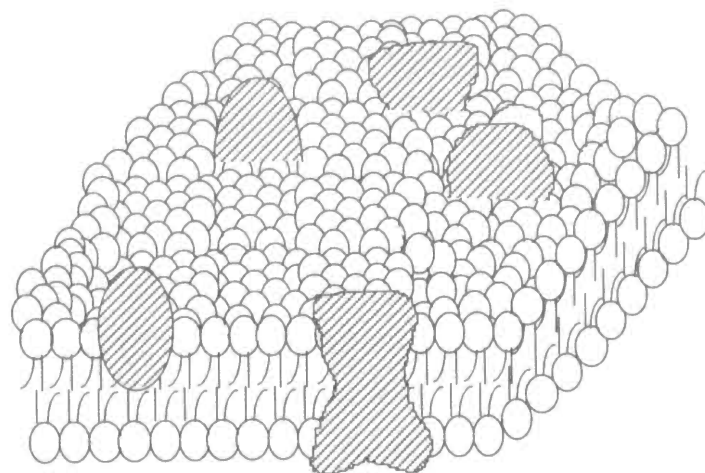


Figure. Schematic diagram of biological membrane.

腎における薬物輸送は細胞膜を介した輸送過程の集積であり、輸送蛋白質自体の活性のみならず、蛋白質が存在する細胞膜の動的状態の影響を受けることが考えられる。Singer and Nicolson の流動モザイクモデルで表されるように、細胞膜において蛋白質は脂質中に浮遊する状態で存在していると考えられる⁽⁸⁻¹⁰⁾(Figure)。腎尿細管刷子縁膜及び側底膜に存在する有機カチオン輸送蛋白質も膜内在性蛋白質であり、細胞膜脂質中に輸送蛋白質が埋め込まれた状態で存在するものと思われる。いわば脂質二重層は輸送蛋白質の機能を発揮するのに必要な土台の役割を果たしていると推察できる。従って輸送蛋白質のみではなく、それをとりまく膜脂質環境及びそれらが蛋白質機能に及ぼす影響について検討することは、薬物の膜輸送現象の詳細を解明するために不可欠と考えられる。

膜流動性は細胞膜の基本的な性質の一つであり、主として膜を構成する脂質の組成によって決定され、膜脂質環境の物理的様式を表す。種々の生理的及び病態生理的な条件によって膜流動性は変動することが知られており、この変動が細胞膜中に存在する酵素などの細胞膜機能を調節することが、赤血球、肝、小腸及び腎など種々の組織において報告されている⁽¹¹⁻¹⁶⁾。しかし、薬物の担体輸送と膜流動性との関連について検討した報告は極めて乏しい。医薬品の体内挙動に腎は極めて重要な役割

を果たすことから、膜流動性の変動による薬物の腎輸送制御について解明することは、医薬品の適正使用を推進していく上で有意義であると考えられる。

そこで著者は膜流動性によるカチオン性薬物の腎排泄の制御機構を明らかにする目的で、腎近位尿細管刷子縁膜、側底膜小胞を用い、その膜流動性を上昇及び低下させた場合の有機カチオン輸送の変動について検討を行った。また、生後間もない哺乳ラットの腎から刷子縁膜小胞を調製し、成熟ラットの刷子縁膜における有機カチオン輸送及び膜流動性との比較検討を行い、発育による有機カチオン輸送の変動と膜流動性の関連についても考察を加えた。これらの結果を、以下三章にわたり論述する。

第I章 刷子縁膜の流動性上昇による有機カチオン輸送の調節

腎臓はネフロンと呼ばれる構造・機能上の単位と血管系から構成され、ネフロンは糸球体とそれに続く尿細管からなり、集合管に接合している。尿細管はさらに部位によって近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位尿細管に大別され、形態や機能も異なっている。特に近位尿細管では glucose やアミノ酸等の栄養物質の吸収や薬物等異物の体外への排泄といった二方向性の経細胞輸送が活発に営まれている。

尿細管上皮細胞は、形態的・機能的に非対称性(極性)を示し、管腔側とそれ以外の側底部分では細胞の表面構造に差が見られるとともに、両者において物質輸送機構や局在酵素など、機能的にも異なっている。尿細管上皮細胞は互いに隣接する細胞と密着結合(tight junction)によって接合しており、細胞膜はその部分で管腔側の刷子縁膜、血管側の側底膜とに区分される。薬物の尿細管分泌は側底膜を介した血管側から細胞内への取り込み、及び刷子縁膜を介した細胞内から管腔側への排出という二つの膜輸送過程の集積であり、その機構を解明するためには両細胞膜を分離・精製し、それぞれの膜における薬物輸送について解析する必要がある。膜小胞系はこうした特定の細胞膜における輸送機構の解析に極めて有用な実験系である⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。近年、刷子縁膜は Mg^{2+} 等の二価カチオン沈殿法により、側底膜は Percoll 自己形成密度勾配法により、純度の高いものが比較的短時間で得られるようになった。こうして得られた刷子縁膜小胞、側底膜小胞を用いた輸送研究によって近位尿細管における glucose やアミノ酸の再吸収機構のみならず、薬物の能動分泌機構の解明も飛躍的に進展した⁽²⁻⁶⁾。

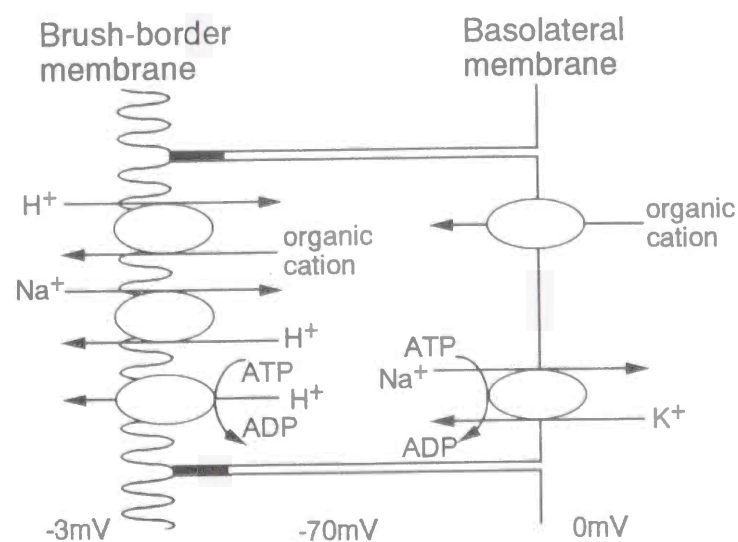


Fig. I-1 Transport systems of organic cation in renal proximal tubules.

腎近位尿細管刷子縁膜において有機カチオンは、基質と逆方向の H^+ 勾配によって駆動される H^+ /有機カチオン逆輸送系を介して能動的に輸送されることが膜小胞系を用いた解析から明らかにされている⁽²⁻⁶⁾ (Fig. I-1)。In vivo においても Na^+/H^+ 交換輸送体等の働きによって尿細管腔側酸性(約 0.5pH unit)の H^+ 勾配が形成されており⁽²⁰⁾、細胞内の有機カチオンはこの H^+ 勾配と共役して管腔側へと汲み出されるものと考えられる。 H^+ /有機カチオン逆輸送系は cimetidine、procainamide、morphine、atropine 等のカチオン性薬物のみならず、cephalexin、cephradine 等の両性イオンであるアミノ- β -ラクタム抗生物質も基質と認識し輸送することが知られている⁽²⁻⁶⁾。このように H^+ /有機カチオン逆輸送系は幅広い基質認識能をもち、様々なイオン性薬物の尿細管分泌に寄与している。

生体膜機能の多くは膜酵素や膜に存在する受容体など膜蛋白の機能によるところが大きい。細胞膜を構成するもう一方の主成分である膜脂質によって形成される脂質二重層は、これら膜機能蛋白に対し、存在の場あるいは活躍の場を提供する役割を果たしている。しかし、それはただ単純に存在の場を与えるのではなく、膜機能蛋白の正常な機能発現に重要な影響を与えている。脂質二重層の物性、膜流動性の変動によって多くの膜機能が影響を受けることが報告されており、また種々の生理的、病態生理的条件により膜流動性が変動することも知られている⁽¹¹⁻¹⁶⁾。しかしこれまで、薬物の担体輸送と膜流動性の関連について検討した報告は見当たらない。

本章ではカチオン性薬物の腎輸送に膜流動性変動が影響を及ぼすのか、またどのような影響を及ぼすかについて考察を加えた。まず、刷子縁膜において膜流動性を上昇させることが知られているアルコール類を用いて、膜流動性の上昇と有機カチオン輸送活性の関連について検討した。刷子縁膜における有機カチオン輸送と比較するため、choline 輸送及び glucose 輸送に及ぼす膜流動性上昇の影響についても解析した。さらに、膜流動性の上昇が側底膜における有機カチオン輸送に影響を及ぼすか否かについても検討を加えた。

I-1 有機カチオン輸送に及ぼすアルコール類の影響

ベンジルアルコール等のアルコール類は速やかに生体膜中に移行し、膜流動性を上昇させることから腎や小腸、肝における種々の膜酵素や glucose、アミノ酸、リン

酸等栄養物質の輸送系へ及ぼす膜流動性変動の影響を検討する目的に用いられている⁽²¹⁻³¹⁾。そこで腎刷子縁膜における有機カチオン輸送が膜流動性変動の影響を受けるかアルコール類を用いて検討した。ラットから調製した刷子縁膜小胞への取り込み実験の基質としては tetraethylammonium (TEA) を、アルコール類はベンジルアルコール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いた。

1-a 刷子縁膜流動性に及ぼすベンジルアルコールの影響

まず、刷子縁膜の流動性に及ぼすベンジルアルコールの影響について検証した。膜流動性は 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いて蛍光偏光解消法により評価した。すなわち、膜中へ予め負荷しておいた蛍光プローブの DPH に偏光した励起光を照射し、これから射出された蛍光の偏光がどの程度維持されているかを測定する。この値が偏光度であり、膜中で蛍光物質の運動が大きいほど、つまり膜流動性が大きいほど偏光は解消されるため、偏光度は小さくなる^(32,33)。

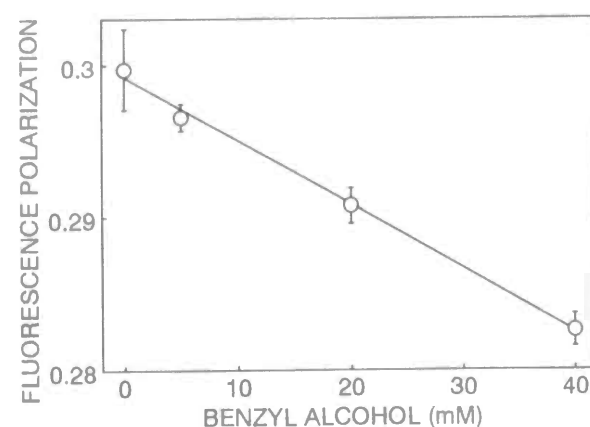


Fig. I-2 **Effect of benzyl alcohol on brush-border membrane fluidity.** Fluorescence polarization of DPH was measured in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.

Fig. I-2 から明らかなように、刷子縁膜小胞に添加したベンジルアルコールの濃度が高いほど DPH の偏光度は減少し、ベンジルアルコールは濃度依存的に刷子縁膜の流動性を上昇させることが確認された。

ベンジルアルコールを膜小胞に添加すると速やかに膜中に移行するが、親水性の水酸基を持つことから脂質二重層の外層にとどまるものと考えられる⁽³⁴⁾。一方、DPH は非極性であるため、外層と内層の中間部付近に配位し、その部分を中心とし

た膜流動性を表す^(16,32)。従ってベンジルアルコールを刷子縁膜小胞に添加した場合、主として脂質二重層の外層から中間部にかけて流動性が上昇するものと考えられる。

1-b 有機カチオン輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響

1-a での検討から刷子縁膜小胞にベンジルアルコールを共存させた場合、膜流動性は上昇することが明らかとなった。そこで次に、ベンジルアルコールが近位尿管刷子縁膜の有機カチオン輸送に及ぼす影響について検討を加えた。

腎刷子縁膜において TEA は逆向き H^+ 勾配によって駆動される H^+ /有機カチオン逆輸送系を介して能動的に輸送される。まず、 H^+ /有機カチオン逆輸送系に及ぼすベンジルアルコールの影響について明らかにするため、駆動力である H^+ 勾配存在下における刷子縁膜小胞への TEA 取り込みを測定した。

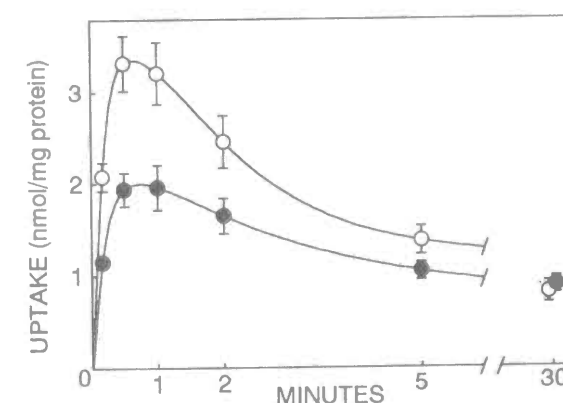


Fig. I-3 **Effect of benzyl alcohol on TEA uptake by brush-border membrane vesicles (with H^+ gradient).** Membrane vesicles (pH 6.0) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [^{14}C]TEA (final 0.25mM) in the absence or presence of benzyl alcohol: control (○); 20mM benzyl alcohol (●).

Fig. I-3 に、小胞内 pH=6.0、小胞外 pH=7.5 とし、外向き H^+ 勾配存在下での TEA 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響について示した。コントロール条件下においては、 H^+ 勾配と共役した顕著な一過性の上り坂輸送(overshoot 現象)が認められる。これは TEA が取り込み初期においては外向き H^+ 勾配を駆動力として小胞内に濃縮的に取り込まれるが、その後時間とともに H^+ 勾配が消失するため TEA 自身の濃度勾配に従った流出の方が大きくなり、最終的には小胞内外の TEA 濃度が等しくなった時点で平衡に達するためである。20mM のベンジルアルコールを共存させたところ、TEA の初期取り込み速度、及び overshoot のピーク値はコントロールと比べ

顕著に低下した。しかし、30 分間の TEA 取り込み、すなわち取り込みの平衡値には変化が認められなかったことからベンジルアルコールによる膜小胞の損傷や内容積の変化は生じていないと考えられる。

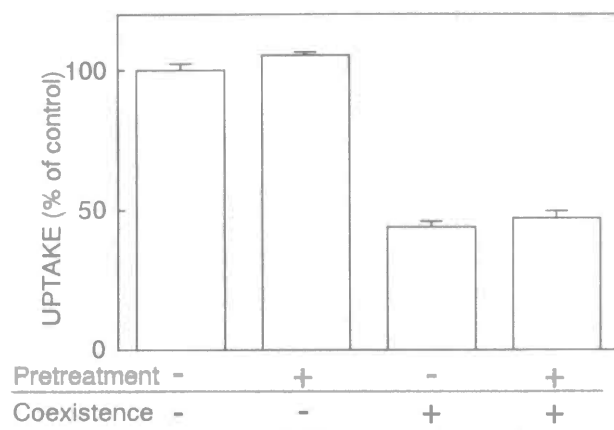


Fig. I-4 **Reversibility of benzyl alcohol effect on TEA uptake by brush-border membrane vesicles.** Membrane vesicles (pH 6.0), pretreated without or with 20mM benzyl alcohol (Pretreatment: - or +, respectively), were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [14 C]TEA (final 0.25mM) in the absence or presence of 20mM benzyl alcohol (Coexistence: - or +, respectively).

次に刷子縁膜小胞に対するベンジルアルコールの影響の可逆性について検討した。膜小胞とベンジルアルコールを5分間インキュベートし、その後緩衝液で洗浄し膜小胞からベンジルアルコールを除く前処理を行った膜小胞と、ベンジルアルコールを含まない緩衝液を用いてインキュベートを行った膜小胞への TEA 取り込みを測定した(Fig. I-4)。Fig. I-4 から明かなように両群の膜小胞への TEA 取り込みに差はなく、また取り込み時にベンジルアルコールを共存させたときの阻害の程度も同一であった。従って膜小胞に対するベンジルアルコールの影響は可逆的であり、蛋白質の変性などの非可逆的な影響はないものと考えられた。

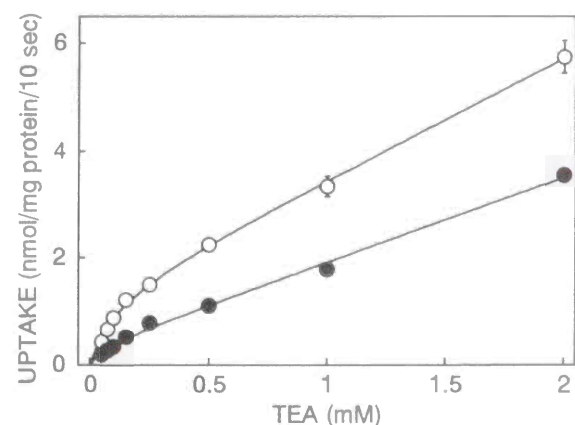


Fig. I-5 **Concentration dependence of TEA uptake.** Membrane vesicles (pH 6.0) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing various concentrations of [14 C]TEA in the absence or presence of benzyl alcohol: control (○); 20mM benzyl alcohol (●).

Fig. I-5 に膜小胞への TEA 取り込みの濃度依存性について示した。TEA の濃度を 0.0625mM から 2mM まで変化させ、外向き H^+ 勾配存在下で TEA の初期取り込み速度を測定したところ、高濃度で飽和現象が認められた。次式によって非線形最小二乗法で解析を行い、速度論的パラメータを算出した。

$$V = V_{max}[S]/(K_m + [S]) + K_d[S]$$

V は初期取り込み速度、[S] は基質初濃度、 V_{max} は輸送系を介する最大輸送速度、 K_m はミカエリス定数、 K_d は非特異的な輸送の係数を示す。 K_m 値はコントロール及びベンジルアルコール共存下でそれぞれ、0.12、0.08mM、 K_d 値は 13.3、9.53 nmol/mg protein/min/mM と両群で大きな差はみられなかった。一方、 V_{max} 値はコントロール条件下では 8.2 nmol/mg protein/min であるがベンジルアルコール共存によって 2.1 nmol/mg protein/min と大きく低下した。従ってベンジルアルコールにより基質親和性は変化せず、輸送体の turnover 速度の変化等により活性が低下するものと考えられた。

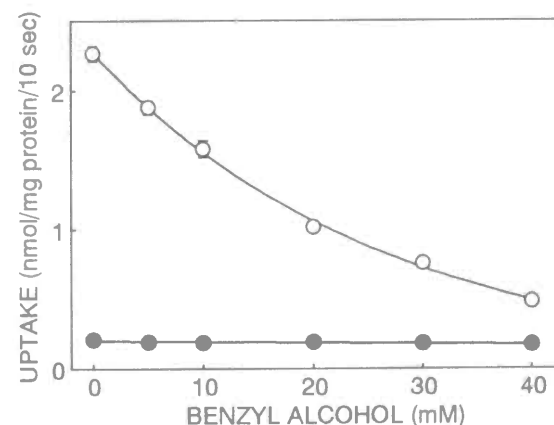


Fig. I-6 **Concentration dependence of the inhibition of TEA uptake by benzyl alcohol.** Membrane vesicles (pH 6.0) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [14 C]TEA (final 0.25mM) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol either without (○) or with (●) 0.1mM cimetidine.

次に有機カチオン輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響の濃度依存性について検討した。種々の濃度のベンジルアルコールを共存させ、外向き H^+ 勾配存在下での刷子縁膜小胞への TEA 取り込みの初期速度を測定した。Fig. I-6 から明らかなように TEA の取り込みはベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害され、その IC_{50} は 18.3mM であった。一方、 H^+ /有機カチオン逆輸送系に高い親和性を持つ cimetidine を共存させ、非特異的な TEA 取り込みを測定したところ、高濃度域においてもベンジルアルコールの影響は認められなかった。従って輸送系を介さない非特異的な TEA の膜透過性はベンジルアルコールによって変化しないことが示された。

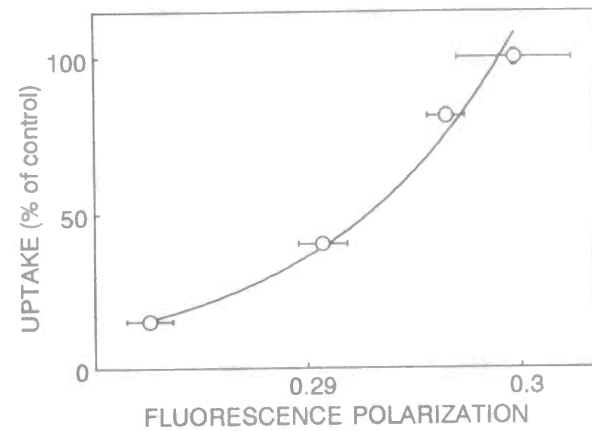


Fig. I-7 Relationship between membrane fluidity and TEA transport in brush-border membranes.

Fig. I-7 に刷子縁膜中での DPH の偏光度と H^+ /有機カチオン逆輸送活性との関連性について示した。流動性が上昇するに従い TEA 輸送は低下し、刷子縁膜の有機カチオン輸送活性は膜流動性に強く支配されることが示された。

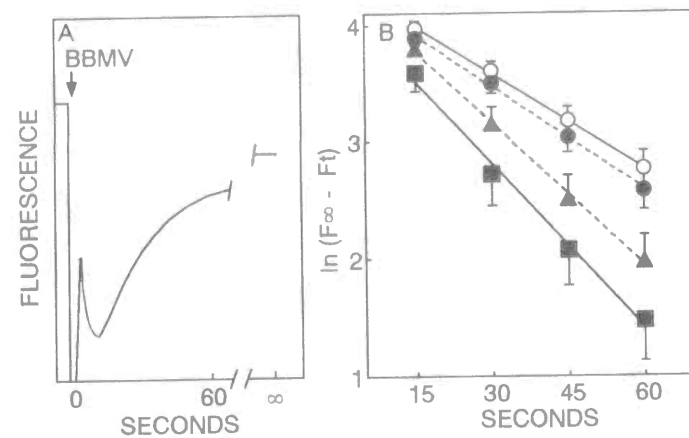


Fig. I-8 Dissipation rate of H^+ gradient in brush-border membrane vesicles. (A) Typical trace of Acridine orange with time. At the arrow, membrane vesicles (pH 6.0) were added to the external buffer (pH 7.5) containing $6\mu M$ Acridine orange. (B) The plots of $\ln(F_\infty - F_t)$ against time showing that the dissipation of the H^+ gradient follows first-order reaction kinetics. External buffer (pH 7.5) containing $6\mu M$ Acridine orange and various concentrations of benzyl alcohol: control (○); 5mM (●), 20mM (▲) and 40mM (■) benzyl alcohol.

ベンジルアルコールによる TEA 輸送阻害の原因の一つとして、駆動力である H^+ 勾配に対する影響が考えられる。そこで Acridine orange を用いた蛍光消光法によって、 H^+ 勾配消失速度に及ぼすベンジルアルコールの影響について検討した。Acridine orange は種々の膜小胞系で小胞内 pH の測定に用いられている⁽³⁵⁻³⁷⁾。その原理は、 H^+ の小胞内への移行に伴い Acridine orange も小胞内に移行するため、Acridine orange

の蛍光が消光することに基づいている。Fig. I-8A に示すように Acridine orange を含む pH7.5 の外液中に、小胞内 pH を 6.0 とした膜小胞を加えた場合、急激な蛍光消光が観察される。その後 Acridine orange の消光は経時的に回復するがこの過程は刷子縁膜を介した H^+ 勾配の消失を反映している。Fig. I-8B は H^+ 勾配が消失した時点での Acridine orange の蛍光と各時間の蛍光の差の対数を時間に対してプロットしたものであり、直線の傾きが急であるほど H^+ 勾配の消失が速いことを表している。Fig. I-8B から明らかなようにベンジルアルコールは刷子縁膜を介した H^+ 勾配の消失を促進することが示された。Ives ら⁽³⁸⁾ はウサギの腎刷子縁膜小胞を調製し、ヘキサノール等の n-アルキルアルコールを用いて膜流動性を上昇させた場合の H^+ 透過性の変化を Acridine orange 蛍光消光法によって測定し、刷子縁膜での H^+ 透過性と膜流動性の関連について検討している。彼らは膜流動性と H^+ 透過性には良い相関がみられ、膜流動性が上昇するに従い H^+ 透過性が上昇すると報告している⁽³⁸⁾。これはベンジルアルコールによって膜流動性が上昇したとき、ラット腎刷子縁膜において H^+ 透過性は上昇し、膜小胞内外の H^+ 勾配の消失が促進されるという本研究の結果と対応している。また、小腸刷子縁膜においても、腎と同様にベンジルアルコールにより膜流動性が上昇するに従って H^+ 透過性が上昇することが報告されている⁽³⁹⁾。

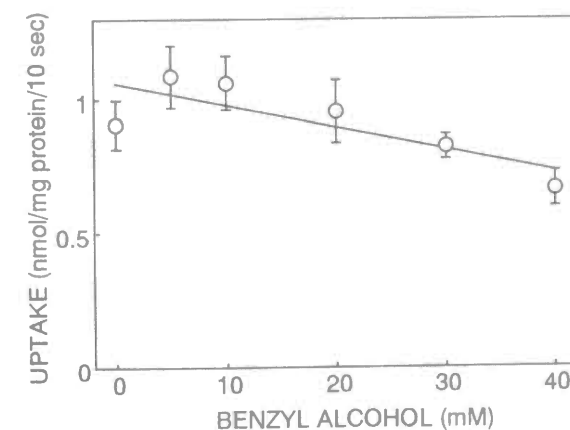


Fig. I-9 Effect of benzyl alcohol on TEA uptake by brush-border membrane vesicles (without H^+ gradient). Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing $2mM$ [^{14}C]TEA (final $1mM$) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.

次に、外向き H^+ 勾配存在下での刷子縁膜小胞への TEA 取り込みに対するベンジルアルコールの阻害効果が、 H^+ 勾配の消失促進のみによるものか、すなわちベンジルアルコールの影響が H^+ 勾配消失過程に対するもののみなのかについて検討を加えた。プロトノフォアである carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を用いて小胞内外の pH を 7.5 に固定し、 H^+ 勾配非存在下における TEA 取り

込みに及ぼすベンジルアルコールの影響を測定したところ、ベンジルアルコールの効果は H^+ 勾配存在下と比べ弱いものであったが、高濃度域において濃度依存的な TEA 取り込み阻害効果が認められた(Fig. I-9)。

Trans-stimulation 効果はある基質がキャリアー輸送される場合に特徴的にみられる現象であり、pH7.5~8.5 のアルカリ性領域では TEA 同士の直接交換により *trans-stimulation* 効果が起こる。すなわち小胞内に非標識の TEA を負荷した場合、小胞外の $[^{14}C]$ TEA との直接交換が起こり $[^{14}C]$ TEA の取り込みが促進される⁽⁴⁰⁾。そこで有機カチオン輸送体へのベンジルアルコールの影響を明確にするため、pH8.0 における *trans-stimulation* 効果に及ぼす影響について検討した。

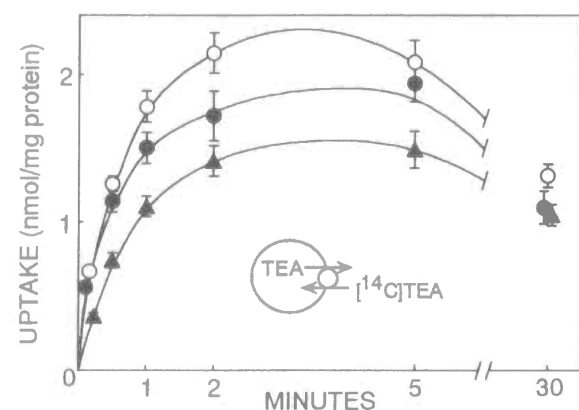


Fig. I-10 **Effect of benzyl alcohol on TEA-TEA exchange.** Membrane vesicles (pH 8.0) preloaded with 2.5mM TEA were incubated with the substrate mixture (pH 8.0) containing 0.278mM $[^{14}C]$ TEA (final 0.25mM) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol: control (○); 5mM (●) and 20mM (▲) benzyl alcohol.

Fig. I-10 に示すように、コントロールと比べ 5mM、20mM のベンジルアルコール共存により TEA の取り込みは阻害された。従ってベンジルアルコールは H^+ 勾配消失過程のみならず有機カチオン輸送体へも影響を与えることが示唆された。すなわち、ベンジルアルコールによって膜流動性が上昇することで駆動力の消失過程と輸送体の両者が影響を受け、有機カチオン輸送活性が低下すると考えられる。

I-c 有機カチオン輸送に及ぼすアルキルアルコールの影響

膜流動性上昇によって有機カチオン輸送が低下されることを明確にするため、膜流動性を上昇させることが知られている n-アルキルアルコールの TEA 輸送に及ぼす影響について検討を加えた。

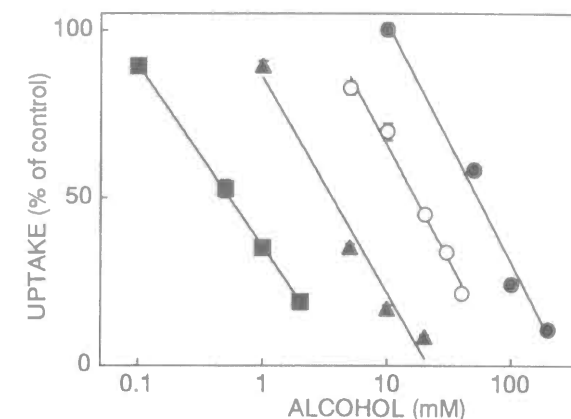


Fig. I-11 **Effect of alcohols on TEA uptake.** Membrane vesicles (pH 6.0) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM $[^{14}C]$ TEA (final 0.25mM) in the presence of various concentrations of alcohols; butyl (●), hexyl (▲), octyl (■) and benzyl (○) alcohol.

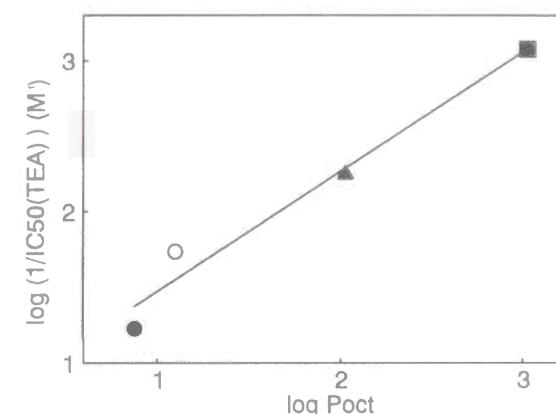


Fig. I-12 **Relationship between logPoct and log(1/IC₅₀(TEA uptake)).** TEA uptake was measured in the presence of butyl (●), hexyl (▲), octyl (■) and benzyl (○) alcohol.

Fig. I-11 から明らかなように n-アルキルアルコールはベンジルアルコールと同様、濃度依存的に TEA 輸送を阻害し、その阻害の強さはオクタノール、ヘキサノール、ブタノールの順であった。Fig. I-12 は各アルコールのオクタノール/水分配係数 (P_{oct})⁽⁴¹⁾と TEA 取り込みに対する IC₅₀の逆数を両対数でプロットしたものであり、アルコールの脂溶性が高いほど TEA の輸送阻害能が強いという関係が示された。

刷子縁膜中での DPH の偏光度も n-アルキルアルコールによって濃度依存的に低下し、膜流動性は上昇した。Fig. I-13 は各アルコールの分配係数と DPH の偏光度低下の IC₅の逆数を両対数でプロットしたものであり、脂溶性が高いほど膜流動性上昇能が強いという関係が見られた。従って脂溶性が高いアルコールほど膜流動性を上昇させ有機カチオン輸送を阻害することから、刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性上昇により低下することが強く示された。

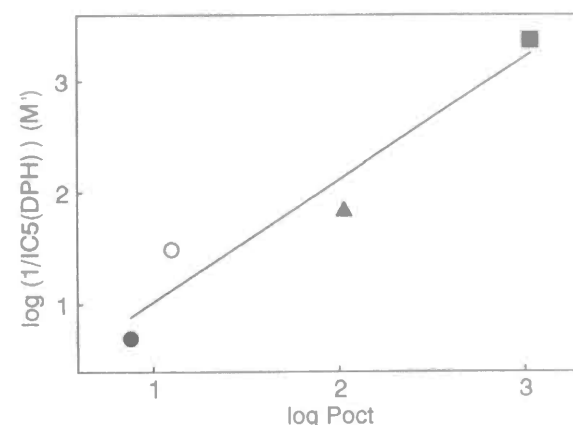


Fig. I-13 Relationship between $\log P_{oct}$ and $\log(1/IC_5(DPH \text{ polarization}))$. Fluorescence polarization of DPH was measured in the presence of butyl (●), hexyl (▲), octyl (■) and benzyl (○) alcohol.

I-2 Choline 及び glucose 輸送に及ぼすアルコールの影響： 有機カチオン輸送系との比較

近位尿細管には栄養物質の再吸収や異物等の排出を行う種々の輸送系が存在することが知られている。Choline 輸送系及び glucose 輸送系は近位尿細管刷子縁膜に存在する輸送系であり、それぞれ膜電位及び Na^+ 勾配を駆動力として choline 及び glucose の再吸収に関与していると考えられている⁽⁴²⁻⁴⁵⁾。そこで、膜流動性上昇が有機カチオン輸送に及ぼす影響と比較するため、choline 及び glucose 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響について検討を加えた。

2-a Choline 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響

Choline は神経伝達物質であるアセチルコリンの前駆体等として生体機能に重要な役割を果たす内因性有機カチオンである⁽⁴⁶⁾。Choline の生理的な重要性のため、脳、肝、小腸等種々の組織でその動態について検討が行われている。腎において、choline は近位尿細管で分泌・再吸収の二方向性の輸送を受け、分泌に関しては H^+ /有機カチオン逆輸送系を介することが報告されている^(1,47,48)。近年、膜小胞系を用いた解析により choline の再吸収に関与すると考えられる、小胞内負の膜電位を駆動力とする choline 輸送系が H^+ /有機カチオン輸送系とは別に存在することが明らかにされた^(42,43)。そこで膜流動性の上昇の影響について H^+ /有機カチオン逆輸送系と比較するため、choline 輸送系に及ぼすベンジルアルコールの影響を検討した。

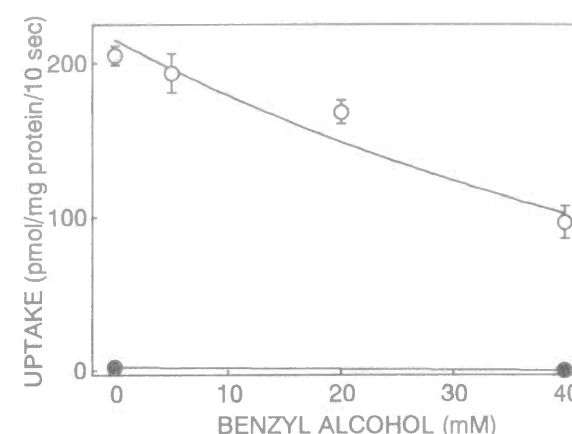


Fig. I-14 Effect of benzyl alcohol on choline uptake (with potential). Membrane vesicles (pH 7.5) preloaded with 100mM K gluconate were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 100mM Na gluconate, 7 μ M valinomycin and 55.6 μ M [3H]choline (final 50 μ M) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol either without (○) or with (●) 40mM unlabeled choline.

Fig. I-14 は外向き K^+ 勾配存在下、valinomycin を添加して小胞内負の膜電位を形成させた条件での choline 取り込みに及ぼすベンジルアルコールの影響について示した。Valinomycin は K^+ イオノフォアとして働くので、小胞内に負荷した K^+ が瞬時に小胞外に流失するため小胞内負の膜電位が形成される。Choline の取り込みはこの小胞内負の膜電位により顕著に促進されることが報告されている^(42,43)。Fig. I-14 から明らかなようにベンジルアルコールは choline の取り込みを濃度依存的に阻害し、その IC_{50} は 37.4mM であった。非標識体の choline を大量に共存させ、非特異的な choline の取り込みを測定したところ、ベンジルアルコールの影響は観察されなかった。従って輸送系を介さない非特異的な choline の膜透過性はベンジルアルコールの影響を受けないものと考えられる。

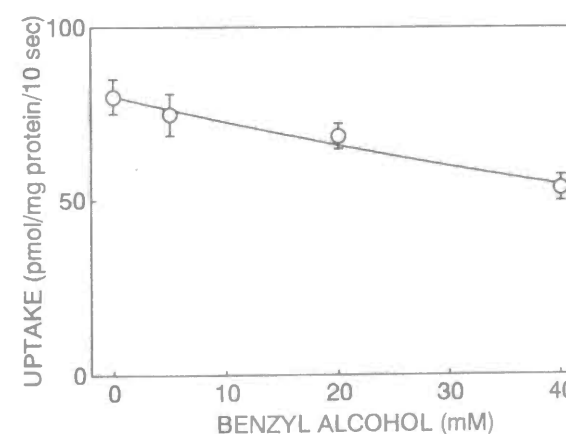


Fig. I-15 Effect of benzyl alcohol on choline uptake (without potential). Membrane vesicles (pH 7.5) preloaded with 100mM K gluconate were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 100mM K gluconate, 7 μ M valinomycin and 55.6 μ M [3H]choline (final 50 μ M) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.

次にベンジルアルコールの影響が駆動力のみに対するものかを明らかにするため、駆動力非存在下における choline 取り込みに及ぼすベンジルアルコールの影響について検討した(Fig. I-15)。小胞内外の K^+ 濃度を一定として膜電位の発生しない条件での choline 取り込みもベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害された。しかしその IC_{50} は 72.0mM と駆動力存在時のものと比べて大きく、阻害効果は駆動力存在時と比べ弱いものであった。従ってベンジルアルコールは駆動力の消失過程と輸送体の両者に影響を与え choline 輸送を阻害することが示唆された。

2-b Glucose 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響

Glucose は生体内でのエネルギー源として極めて重要な物質であり、腎尿細管において内向き Na^+ 勾配を駆動力として濃度勾配に逆らって再吸収されることが古くから知られている。膜小胞系を用いた解析から、腎刷子縁膜において glucose は Na^+ /glucose 共輸送系によって輸送され、その輸送活性は種々の生理的、病態生理的条件によって変動することが報告されている^(44,45)。また、近年の分子生物学的手法の導入により Na^+ /glucose 共輸送体をコードする遺伝子の配列が明らかにされ、輸送体の実体について分子レベルでの解明が進んでいる^(44,45,49,50)。

Na^+ /glucose 共輸送系の活性が遺伝子からの転写、翻訳といった分子レベルで調節されることが近年明らかにされつつあるが、一方、膜流動性の変動によってその活性が変化することも報告されている^(24-29,51,52)。そこで有機カチオン輸送と比較するため、glucose 輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響について検討を加えた。

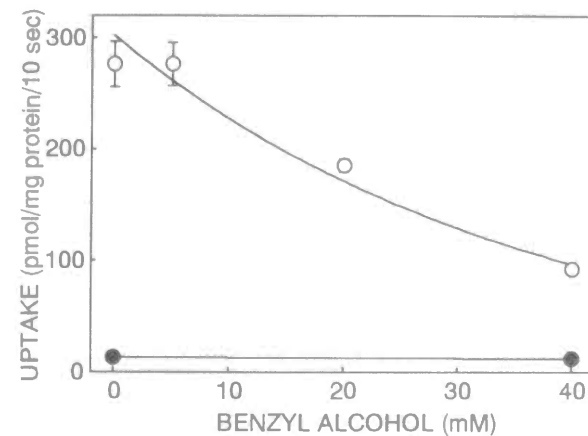


Fig. I-16 Effect of benzyl alcohol on D-glucose uptake (with Na^+ gradient). Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 200mM NaCl and 0.1mM [3H]D-glucose (final 0.05mM) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol either without (○) or with (●) 0.1mM phlorizin.

Fig. I-16 に小胞外 Na^+ 濃度を 100mM、小胞内を 0 として内向き Na^+ 勾配存在下における glucose の取り込みに及ぼすベンジルアルコールの影響について示した。ベンジルアルコールは濃度依存的に glucose 取り込みを阻害し、その IC_{50} は 24.3mM であった。 Na^+ /glucose 共輸送系の特異的阻害剤である phlorizin 存在下ではベンジルアルコールの影響は観察されず、非特異的な glucose の膜透過性はベンジルアルコールにより変化しないことが示された。

次に駆動力非存在下における glucose 取り込みに及ぼすベンジルアルコールの影響について検討した。

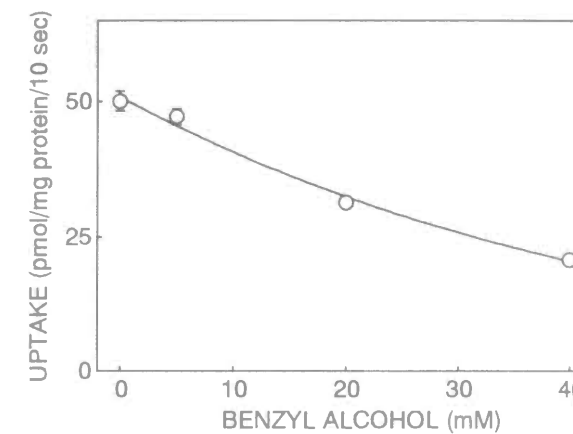


Fig. I-17 Effect of benzyl alcohol on D-glucose uptake (without Na^+ gradient). Membrane vesicles (pH 7.5) preloaded with 100mM NaCl were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 100mM NaCl and 0.1mM [3H]D-glucose (final 0.05mM) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.

Fig. I-17 から明らかなように、小胞内外の Na^+ 濃度を一定とした条件での glucose 取り込みもベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害された。しかしその IC_{50} は 30.6mM と駆動力存在時のものと比べて大きく、阻害効果は駆動力存在時と比べ弱いものであった。従ってベンジルアルコールは駆動力の消失過程と輸送体の両者に影響を与え glucose 輸送を阻害することが示唆された。

Le Grimellec らのグループ^(26,51)ではラット腎刷子縁膜及び培養腎上皮細胞 LLC-PK₁における Na^+ /glucose 共輸送がベンジルアルコールにより阻害されること、また Yusufi ら⁽²⁷⁾もラット腎刷子縁膜における glucose 輸送がベンジルアルコールによって阻害されることを報告している。これらの結果は著者の結果とよく一致するものであり、また Na^+ 勾配存在時の IC_{50} も報告されている値と近いものであった。

これらの結果から、腎刷子縁膜における有機カチオン輸送、choline 輸送、glucose 輸送はいずれもベンジルアルコール共存により膜流動性が上昇した場合、輸送活性が低下することが明らかとなった。しかし、ベンジルアルコールの輸送活性阻害の

IC₅₀は、有機カチオン輸送に対しては 18.3mM、choline 輸送では 37.4mM、glucose 輸送では 24.3mM と異なるものであった。これは輸送系により、膜流動性変動の影響の受けやすさが異なっているためと推察される。また有機カチオン輸送系での IC₅₀が最も小さかったことから、これら輸送系の中では有機カチオン輸送系が膜流動性上昇の影響を最も受けやすい可能性が示唆された。

I-3 側底膜における有機カチオン輸送に及ぼすアルコールの影響：

刷子縁膜との比較

近位尿細管上皮細胞は極性を有し、性質の異なった管腔側刷子縁膜及び血管側側底膜を持つ。その脂質組成、膜流動性は異なっており、また酵素や輸送体の局在も異なることが報告されている⁽⁵³⁻⁵⁵⁾。刷子縁膜は側底膜と比べコレステロールやスフィンゴミエリンの含量が多く、膜流動性が低い。一方、側底膜では刷子縁膜と比べホスファチジルコリンやホスファチジルイノシトールが多く、膜流動性が高い。また膜酵素の局在も異なっており、例えばアルカリ性ホスファターゼは刷子縁膜に、Na⁺/K⁺-ATPase は側底膜に存在する^(15,56-61)。

薬物輸送系も刷子縁膜と側底膜において異なった輸送系が存在すると考えられている⁽²⁻⁶⁾。刷子縁膜において有機カチオンは逆向き H⁺勾配によって駆動される H⁺/有機カチオン逆輸送系を介して輸送されるが、側底膜においては内向きの膜電位により駆動される有機カチオン輸送系を介して輸送される⁽²⁻⁶⁾ (Fig. I-1)。しかし刷子縁膜における H⁺/有機カチオン逆輸送系と比べ、側底膜における有機カチオン輸送系についてはその駆動力や基質認識性等、十分に明らかにされていない点も多い。

腎における薬物の分泌は側底膜を介した血管側から細胞内への移行、及び刷子縁膜を介した細胞内から尿細管腔への移行という二つの過程を介するため、薬物分泌の詳細を知るためには刷子縁膜のみならず側底膜における輸送過程についての情報も必要となる。そこで側底膜における有機カチオン輸送に及ぼす膜流動性変動の影響について検討を加えた。

3-a 側底膜における有機カチオン輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響

まず側底膜の流動性に対するベンジルアルコールの影響について確認した。側底膜中での DPH の偏光度は 0.336 ± 0.002 であり、20mM ベンジルアルコールを添加すると 0.324 ± 0.002 に低下した。従って側底膜においてもベンジルアルコールにより膜流動性が上昇することが明らかとなった。

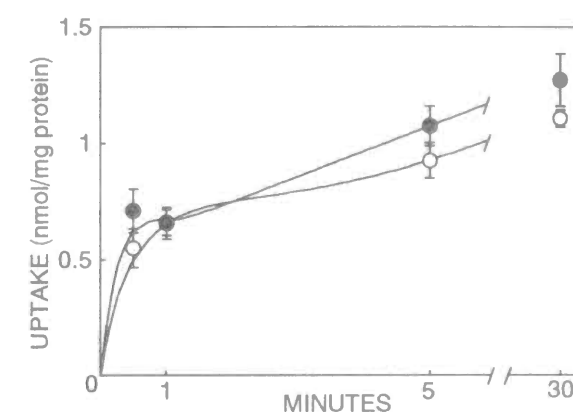


Fig. I-18 **Effect of benzyl alcohol on TEA uptake by basolateral membrane vesicles.** Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 2.5mM [¹⁴C]TEA (final 1.25mM) in the absence or presence of benzyl alcohol: control (○); 20mM benzyl alcohol (●).

次に側底膜小胞への TEA 取り込みに及ぼすベンジルアルコールの影響について検討した。Fig. I-18 から明らかなように 20mM ベンジルアルコールは TEA 取り込みに影響しなかった。

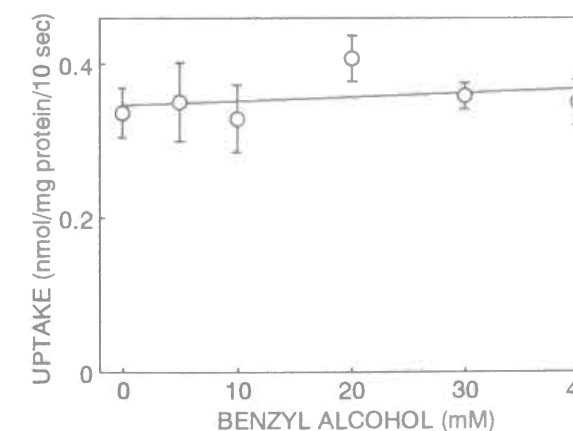


Fig. I-19 **TEA uptake by basolateral membrane vesicles in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.** Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 2.5mM [¹⁴C]TEA (final 1.25mM) in the presence of various concentrations of benzyl alcohol.

さらにベンジルアルコールの濃度を変えて TEA 取り込みに及ぼす影響を検討した (Fig. I-19)。しかし 5-40mM のいずれの濃度においてもベンジルアルコールは TEA 取り込みに影響を及ぼさなかった。従って刷子縁膜と比べ側底膜における有機カチ

オン輸送は膜流動性変動の影響を受けにくく、膜流動性による腎有機カチオン輸送の調節は主として刷子縁膜で行われていると考えられる。

Uranyl nitrate は実験的に急性腎不全を引き起こし、尿細管における有機カチオンの分泌を低下させることが知られている。Inui らのグループ^(62,63)は uranyl nitrate を投与して腎障害を惹起させたラットの腎から刷子縁膜、側底膜小胞を調製し、TEA 取り込みを測定した結果を報告している。彼らは正常ラットから調製した刷子縁膜小胞と比べ、腎障害ラットから調製した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みは小さいものであったのに対し、正常ラット、腎障害ラットの両者から調製した側底膜小胞への TEA 取り込みには差が認められなかったと報告している^(62,63)。この結果は有機カチオン輸送に対する膜流動性変動の影響が側底膜ではみられず、刷子縁膜においてのみ観察された本節での結果と対応しており、能動輸送過程である刷子縁膜輸送の方がより流動性の影響を受けやすいものと考えられた。

3-b 側底膜における有機アニオン輸送に及ぼすベンジルアルコールの影響

腎尿細管には有機カチオン輸送系とは別にアニオン性薬物の分泌に参与する有機アニオン輸送系が存在することが古くから知られている⁽⁶⁴⁾。側底膜における有機アニオン輸送は何らかの輸送体が関与する能動輸送であると考えられていたが、その駆動力は長い間不明であった。近年二つのグループ^(65,66)が膜小胞系を用いた解析により側底膜における有機アニオンの輸送はジカルボン酸を介して間接的に内向き Na^+ 勾配と共役した三次性能動輸送であることを明らかにした。すなわち、側底膜における有機アニオン輸送は 1) Na^+/K^+ -ATPase により Na^+ 勾配 (細胞外 > 細胞内) が形成される、2) ジカルボン酸が Na^+ との共輸送 ($\text{Na}^+/\text{ジカルボン酸共輸送系}$) により細胞内に取り込まれる、3) 血管側の有機アニオンが細胞内のジカルボン酸との交換輸送 (有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送系) により細胞内に取り込まれる、ことによって達成されるものと考えられる。

ラット側底膜小胞による有機アニオン *p*-aminohippurate (PAH) の取り込みは、 Na^+ 勾配存在下においてジカルボン酸である glutarate を添加した場合著しく促進され overshoot 現象が観察された (Fig. I-20)。すなわち内向き Na^+ 勾配により二次的に形成された外向きのジカルボン酸勾配が PAH の能動的な取り込みを引き起こしたと

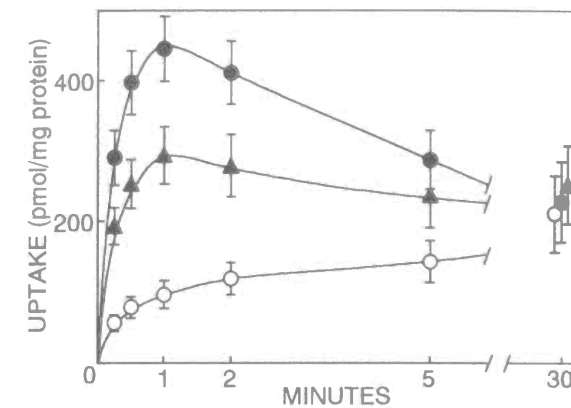


Fig. I-20 PAH uptake by basolateral membrane vesicles. Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.11mM [^{14}C]PAH (final 0.1mM) without (○) or with (●, ▲) 11.1μM glutarate (final 10μM) and either without (○, ●) or with (▲) 22.2mM benzyl alcohol (final 20mM).

考えられる。ベンジルアルコールを共存させたところこの能動的な PAH の取り込みは低下した (Fig. I-20)。これは側底膜における有機アニオン輸送が膜流動性上昇により阻害される可能性を示している。

側底膜における膜流動性上昇による有機アニオン輸送の阻害がどの過程において起こっているかを明らかにするため、 $\text{Na}^+/\text{ジカルボン酸共輸送系}$ 及び有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送系に対するベンジルアルコールの影響について検討した。

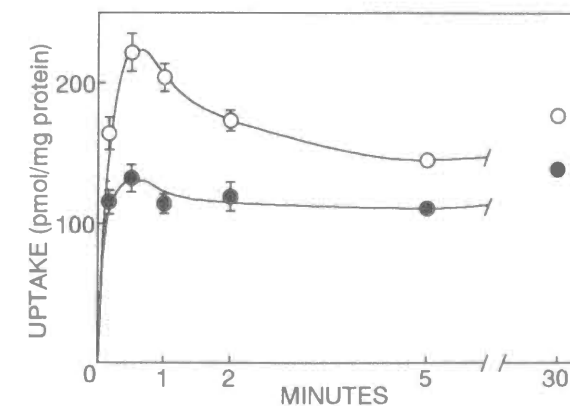


Fig. I-21 Effect of benzyl alcohol on α -ketoglutarate uptake by basolateral membrane vesicles. Membrane vesicles (pH 7.5) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.2mM [^{14}C] α -ketoglutarate (final 0.1mM) in the absence or presence of benzyl alcohol: control (○); 20mM benzyl alcohol (●).

内向き Na^+ 勾配存在下、ジカルボン酸である α -ketoglutarate の取り込みを測定したところ、20mM ベンジルアルコールの共存によって α -ketoglutarate の初期取り込み速度および overshoot のピーク値は大きく低下した (Fig. I-21)。

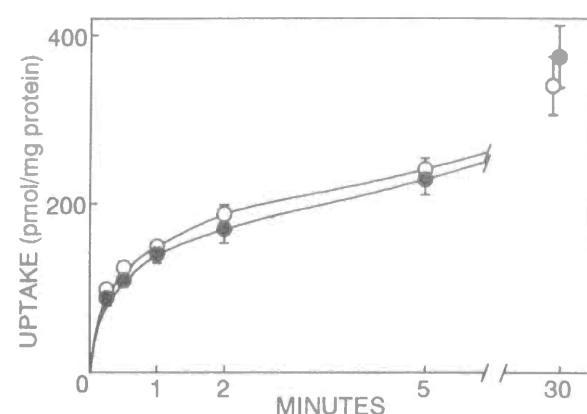


Fig. I-22 **Effect of benzyl alcohol on PAH uptake by basolateral membrane vesicles.** Membrane vesicles (pH 7.5) preloaded with 2.5mM glutarate were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.11mM [14 C]PAH (final 0.1mM) in the absence or presence of benzyl alcohol: control (○); 20mM benzyl alcohol (●).

一方、外向きジカルボン酸勾配存在下での有機アニオンの取り込みはベンジルアルコール共存により変化しなかったため、有機アニオン/ジカルボン酸交換輸送系に対するベンジルアルコールの影響は小さいものと考えられた(Fig. I-22)。従って Fig. I-20 で観察された Na^+ 勾配に依存しジカルボン酸で促進される有機アニオン輸送に対するベンジルアルコールの阻害効果は、主として Na^+ /ジカルボン酸共輸送の低下によるものと考えられる。

Inui ら⁽⁶³⁾は uranyl nitrate を投与して腎障害を惹起させたラットの腎から側底膜小胞を調製し有機イオンの取り込みを測定したところ、正常ラットから調製した膜小胞と比べて PAH の取り込みは小さいものであったが、TEA 取り込みには差が認められなかったことを報告している。また側底膜を介する輸送を反映していると考えられる腎皮質切片への PAH の取り込みはブタノール等の n-アルキルアルコールによって低下するが、TEA の取り込みは変化しないという報告がある⁽⁶⁷⁾。従って疾患等によって引き起こされる膜流動性の変動に対し、側底膜における有機アニオン輸送は有機カチオン輸送と比べ、より影響を受けやすいことが推察される。

I-4 考察

近年、膜小胞を用いた実験系により、腎における薬物輸送機構について、近位尿細管刷子縁膜、側底膜における有機カチオン輸送系並びに有機アニオン輸送系の輸送形式やその駆動力、化学修飾試薬を用いた活性調節に関与する輸送蛋白のアミノ酸残基の同定、病態時における輸送の変動とその要因等、多岐にわたり解明が進められ膜レベルで多くの情報が蓄積されてきた⁽²⁻⁶⁾。また遺伝子工学の導入により輸送

蛋白質をコードする遺伝子を解明する試みが行われはじめる等、生体膜を介する薬物輸送に関してこれら生化学的な側面からの研究の進歩は目覚ましいものがある。一方、生体膜の基本骨格を形成する脂質二重層が薬物輸送に果たす役割など薬物輸送に関する物理化学的な側面からの研究はこれまでほとんど行われてきていない。本研究では脂質二重層の流動的な性質がカチオン性薬物の腎輸送に果たす役割について究明する目的で、まず刷子縁膜の流動性が上昇した場合の有機カチオン輸送活性の変動について精査した。

アルコール類のような疎水性物質が膜流動性を上昇させ、酵素等の膜機能に影響を及ぼすことが赤血球や肝、小腸および腎等で知られている^(15,16,21-31)。アルコール類の膜流動性上昇効果は各アルコールの疎水性度、すなわち油/水分配係数(オクタノール/水分配係数)が高いほど大きい⁽⁴¹⁾。本研究ではベンジルアルコール及び n-アルキルアルコールを腎刷子縁膜小胞に添加することにより、膜中での DPH の蛍光偏光度は濃度依存的に低下し、膜流動性が上昇することが確認された。またアルコール類を刷子縁膜に共存させたとき、有機カチオン TEA の輸送は濃度依存的に阻害された。しかしその阻害効果は各アルコールによって異なっており、TEA 輸送阻害の IC_{50} はオクタノール、ヘキサノール、ベンジルアルコール、ブタノールの順に大きくなった。これは分配係数の逆数とよく対応しており、疎水性が高いアルコールほど有機カチオン輸送阻害効果は大きかった。また種々の濃度のベンジルアルコールを用い、膜流動性と有機カチオン輸送活性を測定したところ、両者には良い相関が認められた。これらの結果から、腎刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性変動の影響を受け、膜流動性が上昇したとき輸送活性は低下することが明らかとなった。

アルコールを膜小胞に添加することにより、膜小胞の形状が変化することが考えられる。しかし、平衡状態に達したときの TEA の取り込みにアルコール共存、非共存による差は少なく、アルコールによる膜小胞の損傷や内容積の変化は生じていないと考えられる。また高濃度のアルコールでは蛋白の変性など非可逆的な損傷が考えられるが、ベンジルアルコールの輸送阻害効果が可逆的であることは確認しており、本研究で用いた濃度範囲ではそのような蛋白の損傷は起こっていないと考えられる。輸送実験の基質に用いた TEA は水溶性であり、単純拡散では腎刷子縁膜を通過しにくく、膜小胞への TEA の取り込みは大部分、 H^+ /有機カチオン逆輸送系を介

する。H⁺/有機カチオン逆輸送系に高い親和性を有する cimetidine を大量に共存させたとき、TEA の取り込みは大きく低下する。ベンジルアルコールはこのときの輸送系を介さない TEA 取り込みには影響を及ぼさなかった。従ってアルコールによる膜流動性の上昇は、H⁺/有機カチオン逆輸送系に対して影響を与えるものと考えられる。

H⁺/有機カチオン逆輸送系は刷子縁膜に存在する Na⁺/H⁺交換輸送体等の働きによって形成される細胞外から細胞内への内向き H⁺勾配を駆動力とする。刷子縁膜を介する H⁺勾配の維持やその消失速度は有機カチオンの輸送に大きく影響する。刷子縁膜小胞におけるアルコールによる有機カチオン輸送の阻害効果が駆動力である H⁺勾配の消失を促進したためなのか、Acridine orange 蛍光消光法を用いて H⁺の透過性を測定したところ、ベンジルアルコールの共存によって H⁺透過性は促進された。しかし、H⁺勾配非存在下での TEA 輸送、及び H⁺非依存性の TEA-TEA 直接交換輸送に対してもベンジルアルコールは阻害効果を示した。これらの結果からベンジルアルコールは膜流動性を上昇させることで、駆動力の消失過程と輸送体の両者に影響を与え、有機カチオン輸送活性を低下させると考えられる。H⁺/有機カチオン逆輸送系とは異なる、choline 輸送系、Na⁺/glucose 共輸送系に対してもベンジルアルコールは輸送阻害効果を示したが、両者とも駆動力存在時の取り込みに対する阻害効果の方が、駆動力非存在時の阻害効果より強いものであった。従って choline 輸送系、Na⁺/glucose 共輸送系においてもベンジルアルコールは駆動力の消失過程と輸送体の両者に影響を与えるものと推察されるが、詳細については駆動力の消失速度に及ぼす影響を測定する等の検討が必要と思われる。

Molitoris らは腎刷子縁膜における glucose 輸送に及ぼす虚血の影響について、膜小胞系及び培養細胞系を用いて詳細な検討を行っている⁽⁶⁸⁻⁷²⁾。彼らの報告によると、虚血により急性的な腎障害が起き、近位尿細管上皮細胞で刷子縁膜と側底膜を隔ている tight junction の崩壊が起こる。そのため刷子縁膜と側底膜を構成する脂質の混合が起こり、刷子縁膜の流動性は上昇する。刷子縁膜における glucose の輸送活性も虚血によって低下するが、この glucose 輸送の低下と刷子縁膜流動性の上昇にはよい相関関係が見られる。従って、虚血により引き起こされた刷子縁膜流動性の上昇が glucose 輸送系の活性低下の一因となっていると推察している。これはベンジルアルコールにより刷子縁膜流動性が上昇した場合、glucose 輸送が低下するという本研究の結果と対応していると考えられる。有機カチオン輸送に及ぼす虚血の影

響については Maeda ら⁽⁷³⁾が検討しており、Molitoris らの方法と同様に腎動脈をクリップして虚血状態とした腎から刷子縁膜小胞を調製し、TEA の輸送活性を測定したところ、虚血腎から調製した膜小胞への TEA の取り込みはコントロールの腎から調製した膜小胞と比べて低いものであったと報告している。有機カチオン輸送活性と同時に、虚血腎から調製した刷子縁膜の流動性を直接測定しているわけではないものの、Molitoris らは虚血腎から調製した刷子縁膜では膜流動性が高くなっていると報告していること、本章の結果から膜流動性が上昇した場合、有機カチオン輸送活性は低下すること、を併せ考えると、膜流動性の上昇が虚血による有機カチオン輸送の低下の一因であることが示唆される。

シスプラチンは固形癌の治療に広く用いられる抗癌剤であるが、その投与量は主たる副作用である腎毒性により制限される。シスプラチンの標的部位は近位尿細管であり、水や Na⁺、glucose の再吸収等の尿細管機能を低下させることが知られている^(74,75)。シスプラチンを投与したラット腎から調製した刷子縁膜小胞への glucose の取り込みはコントロール群と比べて低く、シスプラチンによって刷子縁膜に存在する glucose 輸送系の活性が低下することも報告されている^(76,77)。Courjault-Gautier ら⁽⁷⁸⁾は初代培養近位尿細管細胞系を用いた検討から、シスプラチンによって刷子縁膜の流動性が上昇すること、刷子縁膜における glucose 輸送活性は低下することを明らかにしている。Glucose 輸送活性及び有機カチオン輸送活性が膜流動性上昇により低下するという本章の結果と併せ考えると、シスプラチンによる膜流動性上昇が腎毒性の一因であり、シスプラチン服用患者においてはカチオン性薬物の腎排泄も低下している可能性が考えられる。

本章では刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性変動の影響を受けること、膜流動性が上昇したとき輸送活性は低下することを明らかにした。これらの結果は腎尿管上皮細胞を介したカチオン性薬物輸送の活性調節因子としての膜脂質二重層の役割や、膜流動性上昇を伴う病態時の輸送変化について更なる解明を進める上で、有用な基礎的知見であると考えられる。

第II章 刷子縁膜の流動性低下による有機カチオン輸送の調節

刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性変動の影響を受け、流動性が上昇した場合、輸送活性は低下することを前章で明らかにした。一方、生理的及び病態生理的な条件によっては膜流動性が上昇するばかりではなく、逆に流動性が低下することも報告されている^(12,13,15)。

コレステロールは刷子縁膜脂質の重要な構成成分であり、膜流動性の決定に大きな役割を果たしている。腎尿細管上皮細胞は極性を有し、tight junction によって刷子縁膜と側底膜が分離されており、両者では膜流動性が異なり、刷子縁膜流動性は側底膜と比べて低いことが知られている。これは腎に限らず小腸や肝でも認められている。また非上皮系の細胞膜との比較から、側底膜での流動性が高いのではなく、刷子縁膜の流動性が特徴的に低いものと考えられている^(15,53,56-61,79,80)。その原因の一つとして刷子縁膜脂質中でコレステロールが占める比率の高いことが挙げられる^(15,53,59,60)。よって刷子縁膜と側底膜におけるコレステロール含量の違いが近位尿細管における方向選択的な物質輸送に重要な役割を果たしていることが推察される。また、疾患時に腎刷子縁膜中のコレステロール含量が変動することも報告されている^(15,69,81-83)。

従って、腎刷子縁膜中のコレステロール含量が増加し、膜流動性が低下した場合、有機カチオン輸送が変動することが考えられるが、これまで膜流動性の低下と有機カチオン輸送の関連性についての報告は見当たらない。そこで本章では、ラット腎から調製した刷子縁膜小胞中のコレステロール含量を修飾することによって流動性を低下させ、膜流動性低下による有機カチオン輸送の変化について検討を加えた。

II-1 刷子縁膜流動性に及ぼすコレステロールの影響

コレステロールは脂質膜の流動性の決定に重要な役割を果たすことが古くから知られ、人工脂質二重膜であるリポソームを用いて活発に研究が行われてきた⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾。その結果、コレステロールは脂質の相転移温度以上では膜流動性を低下させる安定化作用を示し、相転移温度以下では逆に流動性を上昇させる流動化作用を示すという二面性を持つことが明らかにされた。

そこで、まずラット腎から単離した膜小胞を親水性のコレステロールエステルである cholesteryl hemisuccinate で処理することによって刷子縁膜中のコレステロール含量を修飾し、コレステロール含量と膜流動性の関連について検討を加えた。

1-a コレステロール処理による刷子縁膜コレステロール含量の変化

刷子縁膜中のコレステロール含量は、調製した膜小胞へコレステロールのエステル体であり親水性の cholesteryl hemisuccinate (CHS)を加え、37℃で一時間インキュベートを行い変化させた。

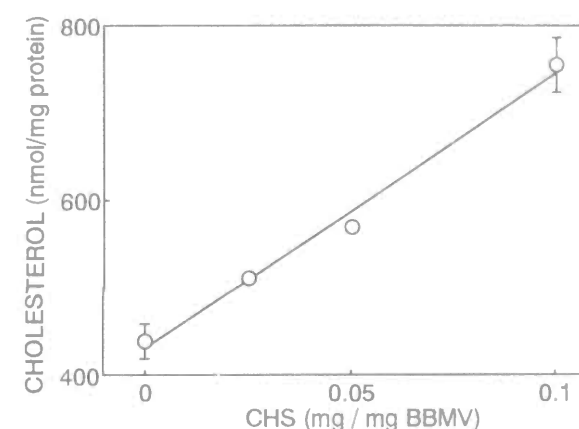


Fig. II-1 Effect of CHS treatment on cholesterol content in brush-border membranes. Membrane vesicles were treated with various concentrations of CHS.

Fig. II-1 は加えた CHS 量と処理後の刷子縁膜中でのコレステロール含量を示している。処理に用いた CHS 量に比例して刷子縁膜中のコレステロール含量は増加しており、CHS 処理により刷子縁膜中のコレステロール含量が変化することが確認された。

1-b コレステロール処理による刷子縁膜流動性の変化

次に第I章と同様に DPH を用いて蛍光偏光解消法により CHS 処理による刷子縁膜流動性の変化について検討した。Fig. II-2 は種々の量の CHS で処理した刷子縁膜中での DPH の偏光度を表している。測定温度が 25℃及び 37℃のいずれにおいても DPH の偏光度は処理に用いた CHS 量に比例して増加しており、CHS 処理によって膜流動性は低下することが明らかとなった。このようにコレステロールは脂質の相

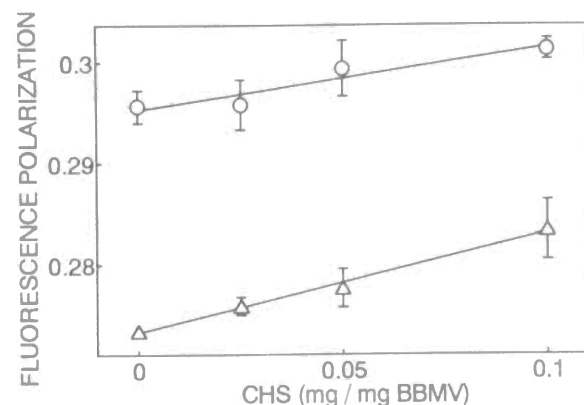


Fig. II-2 **Effect of CHS treatment on brush-border membrane fluidity.** Fluorescence polarization of DPH was measured at 25°C (○) or 37°C (△).

転移温度を境として膜流動性を低下する作用と上昇する作用の二面性を示すが、ラット腎刷子縁膜中では 25°C 及び 37°C の両方で膜流動性低下作用を示すことが確認された。一種類の脂質のみからなる人工膜とは異なり、腎刷子縁膜は他種類の脂質により構成されるためはっきりとした相転移を示さないか、あるいは相転移温度が 25°C から 37°C の範囲外であるため、25°C 及び 37°C の両方でコレステロールは膜流動性低下作用を示したと思われる⁽⁶¹⁾。

CHS 処理により膜流動性を調節する試みは他のグループによっても行われている⁽⁸⁷⁻⁹⁰⁾。Yuli ら⁽⁸⁹⁾はヒト赤血球及びマウス 3T3 繊維芽細胞を用い、著者と同様の方法で CHS 処理を行いコレステロール含量と膜流動性の関連について検討し、膜中に導入されたコレステロール量の上昇に比例して流動性は低下することを報告している。彼らの結果からも膜中でコレステロール含量が増加すると膜流動性が低下することがわかる。

II-2 有機カチオン輸送に及ぼすコレステロールの影響

腎刷子縁膜中のコレステロール/リン脂質の比率は側底膜と比べて高く、刷子縁膜と側底膜ではコレステロール含量に違いがあることが報告されている^(15,53,59,60)。これは血管中から尿細管腔中へ、あるいは尿細管腔中から血管中へという腎尿細管における方向選択的な物質輸送に重要な役割を果たしていることが推察される。また II-1 節で明らかにしたように、コレステロールは腎刷子縁膜の流動性の決定に大きな役割を果たしている。従ってコレステロール含量の変化は刷子縁膜を介する有機カチオン等の物質の輸送に影響を及ぼすことが考えられる。そこで有機カチオン及

び glucose 輸送に及ぼすコレステロールの影響について検討を加えた。

2-a コレステロール処理による有機カチオン輸送の変化

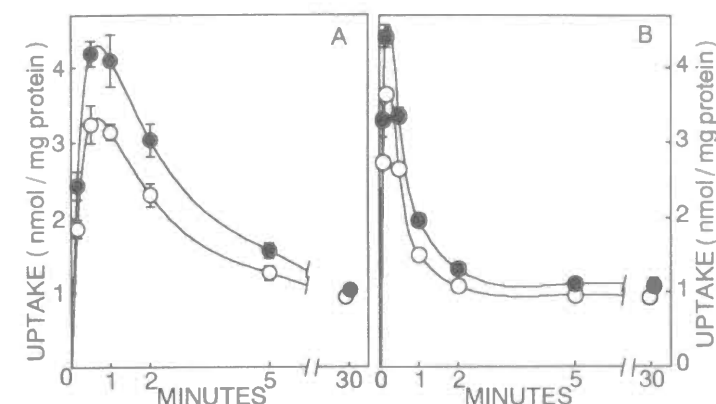


Fig. II-3 **Effect of CHS treatment on TEA uptake by brush-border membrane vesicles (with H⁺ gradient).** Membrane vesicles (pH 6.0) treated with ethanol (○) or 0.05mg CHS/mg protein (●) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [¹⁴C]TEA (final 0.25mM) at 25°C (A) or 37°C (B).

Fig. II-3 に刷子縁膜小胞内 pH 6.0、小胞外 pH 7.5 とし、外向き H⁺勾配存在下での TEA 取り込みに及ぼす CHS 処理の影響について示した。25°C 及び 37°C のいずれにおいても CHS 処理によって TEA 取り込みの初期取り込み速度及び overshoot のピーク値は増大した。一方 30 分間の TEA 取り込み、すなわち取り込みの平衡値には変化が認められなかったことから CHS 処理により膜小胞の損傷や内容積の変化は生じていないと考えられる。25°C 及び 37°C の両方で CHS 処理による TEA 取り込みの促進効果が認められたことから以下の実験は全て 25°C で行った。

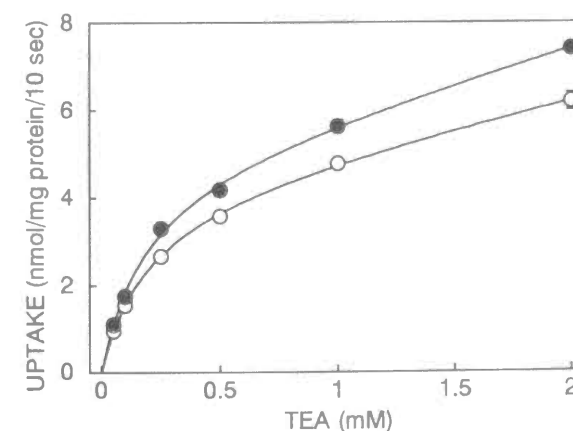


Fig. II-4 **Concentration dependence of TEA uptake.** Membrane vesicles (pH 6.0) treated with ethanol (○) or 0.05mg CHS/mg protein (●) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing various concentrations of [¹⁴C]TEA.

Fig. II-4 に CHS 処理した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みの濃度依存性について示した。TEA の濃度を 0.0625mM から 2mM まで変化させ、外向き H^+ 勾配存在下、TEA の初期取り込み速度を測定したところ、高濃度で飽和現象が認められた。次式によって非線形最小二乗法で解析を行い、速度論的パラメータを算出した。

$$V = V_{max}[S]/(K_m + [S]) + K_d[S]$$

V は初期取り込み速度、[S] は基質初濃度、 V_{max} は輸送系を介する最大輸送速度、 K_m はミカエリス定数、 K_d は非特異的な輸送の係数を示す。 K_m 値はコントロール群及び CHS 処理群でそれぞれ、0.18、0.24mM、 K_d 値は 8.23、7.45 nmol/mg protein/min/mM と両者で大きな差はみられなかった。一方、CHS 処理した刷子縁膜小胞での V_{max} 値は 32.9 nmol/mg protein/min とコントロールの 23.8 nmol/mg protein/min と比べ大きなものであった。従って CHS 処理により基質親和性は変化せず、 V_{max} によって表される輸送体の turnover 等が上昇しているものと考えられる。

次にコレステロールによる TEA 取り込みの上昇効果の濃度依存性を検討するため、種々の量の CHS で処理した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みを測定した。

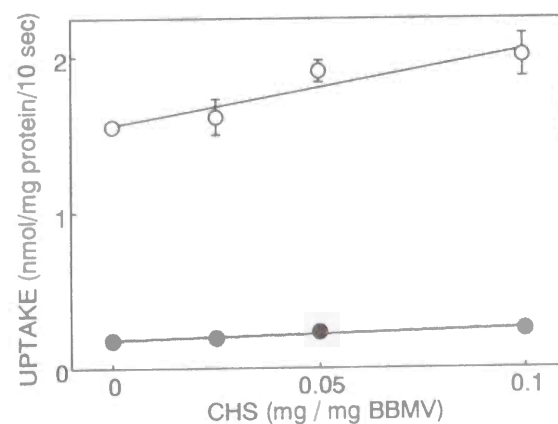


Fig. II-5 Concentration dependence of the stimulation of TEA uptake by cholesterol enrichment. Membrane vesicles (pH 6.0) treated with various concentrations of CHS were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [^{14}C]TEA (final 0.25mM) either without (○) or with (●) 0.1mM cimetidine.

Fig. II-5 から明らかなように H^+ 勾配存在下での TEA 取り込みの初期速度は処理に用いた CHS の量に比例して増大した。一方、 H^+ 有機カチオン逆輸送系の高親和性基質である cimetidine を共存させ、非特異的な TEA 取り込みを測定したところ、CHS 処理の影響は小さなものであった。速度論的解析から求めた非特異的な TEA 輸送を示す K_d 値も CHS 処理により大きな変化を生じなかったことを併せ考えると、TEA の非特異的な膜透過性はコレステロールによる影響が小さいものと考えられる。

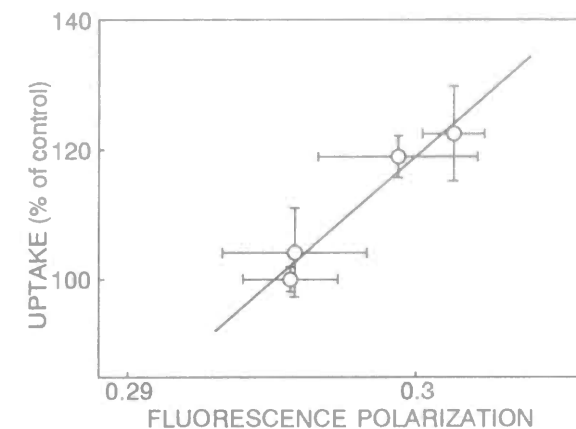


Fig. II-6 Relationship between membrane fluidity and TEA transport in brush-border membranes.

Fig. II-6 に刷子縁膜流動性と H^+ 有機カチオン逆輸送活性との関連性について示した。CHS 処理により刷子縁膜中のコレステロール含量が増加し DPH の偏光度が増加するに従って TEA 取り込みは増加し、良好な相関関係が認められた ($r=0.989$, $p<0.05$)。従って腎刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性低下により上昇することが明らかとなった。

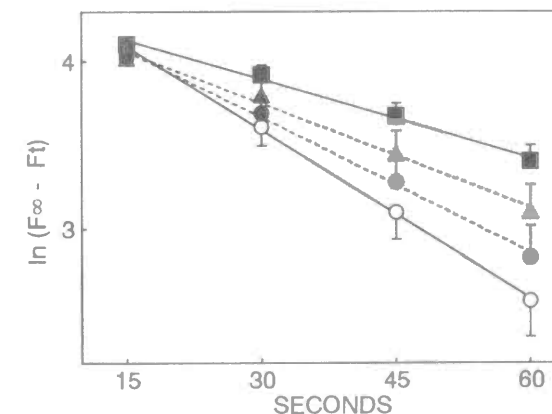


Fig. II-7 Dissipation rate of H^+ gradient in brush-border membrane vesicles. The plots of $\ln(F_{\infty} - F_t)$ against time showing that the dissipation of the H^+ gradient follows first-order reaction kinetics. Membrane vesicles were treated with various concentration of CHS: control (○); 0.025 mg CHS/mg protein (●), 0.05 mg CHS/mg protein (▲) and 0.1 mg CHS/mg protein (■).

コレステロール含量の増加によって有機カチオン輸送活性が上昇する原因の一つとして駆動力である H^+ 勾配の消失に対する影響が考えられる。そこで H^+ 勾配消失速度に及ぼす CHS 処理の影響について Acridine orange 蛍光消光法を用いて検討したところ、Fig. II-7 に示す通り、処理に用いた CHS 量に比例して H^+ 勾配の消失は遅延した。

H^+ 勾配の消失遅延のみがコレステロール含量増加による有機カチオン輸送活性上昇の原因であるか、さらに検討を加えた。

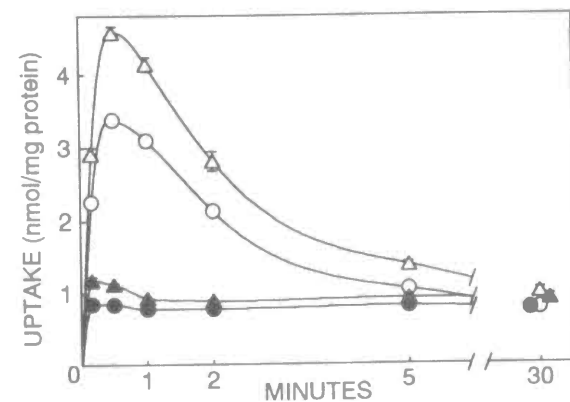


Fig. II-8 Effect of FCCP on TEA uptake (with H^+ gradient). Membrane vesicles (pH 6.0) treated with ethanol (○, ●) or 0.05mg CHS/mg protein (△, ▲) were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [^{14}C]TEA (final 0.25mM) either without (○, △) or with (●, ▲) 40 μ M FCCP.

Fig. II-8 に外向き H^+ 勾配存在下での TEA 取り込みに及ぼす FCCP の影響について示した。FCCP はプロトノフォアであり小胞内外の H^+ 勾配を消失させる⁽⁴⁰⁾。FCCP 共存によりコントロール及び CHS 処理の両群で TEA 取り込みは大きく低下した。しかし FCCP 共存下でも CHS 処理を行った膜小胞への TEA 取り込みはコントロール群と比べ大きいものであった。

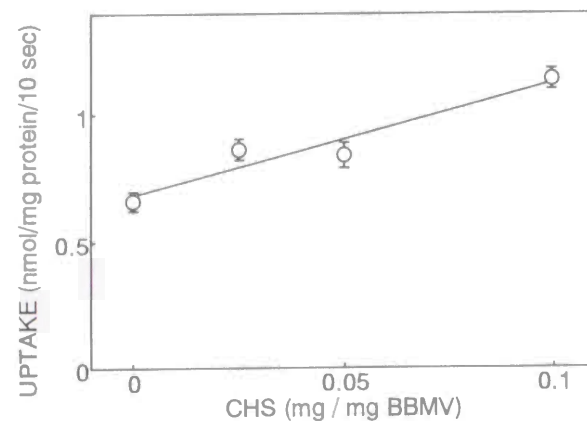


Fig. II-9 Effect of CHS treatment on TEA uptake (without H^+ gradient). Membrane vesicles (pH 7.5) treated with various concentrations of CHS were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 2mM [^{14}C]TEA (final 1mM).

小胞内外の pH を 7.5 とし、 H^+ 勾配非存在下における TEA 取り込みに及ぼす CHS 処理の影響についても検討を加えた。Fig. II-9 に示すように H^+ 勾配非存在下においても TEA 取り込みは処理に用いた CHS 量に比例して増大した。従ってコレステロール含量の増加は駆動力の消失過程と輸送体の両者に影響を与え、有機カチオン輸送活性を上昇させることが示唆された。

2-b コレステロール処理による glucose 輸送の変化

腎近位尿細管には種々の輸送系が存在し、方向選択的な物質輸送に関与していることが知られている。Glucose は腎刷子縁膜において Na^+ /glucose 共輸送系を介して能動的に輸送され再吸収されるが、I-2 節で明らかにしたように膜流動性が上昇した場合、glucose 輸送活性は低下する。有機カチオン輸送と比較するため、膜流動性が低下した場合の glucose 輸送の変動について検討を加えた。

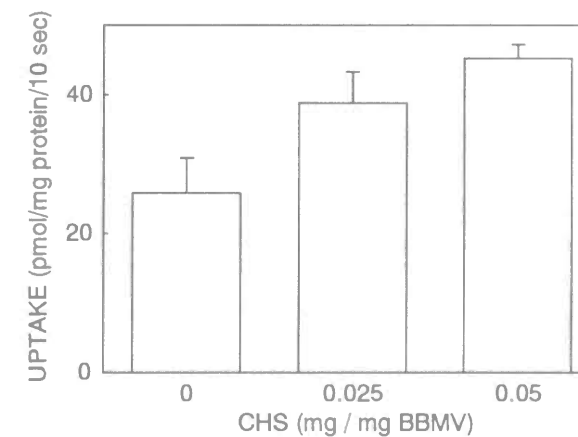


Fig. II-10 Effect of CHS treatment on D-glucose uptake (without Na^+ gradient). Membrane vesicles (pH 7.5) treated with various concentration of CHS were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.1mM [3H]D-glucose (final 0.05mM).

Fig. II-10 に小胞内外の Na^+ 濃度を 100mM とし駆動力である Na^+ 勾配非存在下における glucose の取り込みを測定した結果を示した。CHS 処理した膜小胞への glucose の取り込みはコントロールと比べて大きいものであった。このように Na^+ 勾配非存在下での glucose 取り込みが CHS 処理によって上昇することから、 Na^+ /glucose 共輸送体の活性は刷子縁膜中のコレステロール含量の増加により上昇するものと考えられる。

CHS 処理 (0.05mg CHS/mg BBMV) によって H^+ 勾配非存在下での TEA の初期取り込み速度はコントロール群の 114% に上昇するのに対し、glucose 取り込みは同用量の CHS 処理で 127% に上昇した。I-2 節で示したようにベンジルアルコールによる輸送の阻害効果は glucose よりも TEA で大きく、膜流動性上昇の影響は有機カチオン輸送の方が大きかったが、コレステロールによる膜流動性低下の影響は逆に有機カチオン輸送よりも glucose 輸送でより大きかった。

コレステロールと glucose 輸送の関連については Imai ら⁽⁸³⁾、Molitoris ら⁽⁶⁹⁾ が病態時における刷子縁膜中のコレステロール含量と glucose 輸送の変動について検討し

ており、著者の結果と同様に、コレステロール含量が高いほど glucose 輸送は大きいことを報告している。また彼らは駆動力である Na^+ 勾配の消失過程に及ぼすコレステロールの影響についても解析しており、 Na^+ の透過性はコレステロール含量によって影響を受けないことを示している^(69,83)。これはコレステロールによる glucose 輸送の促進効果は Na^+ /glucose 共輸送体の活性の上昇によるという本研究の結果と対応するものと考えられる。

II-3 考察

細胞膜中のコレステロール含量は多くの膜酵素や輸送蛋白質の活性に影響を与えることが知られている^(12,13,85,87-95)。細胞膜中でのコレステロールの役割を研究する方法としては、実験的に *in vitro* でコレステロール含量を変化させる方法⁽⁸⁷⁻⁹²⁾、病態生理的なコレステロール含量の変化を利用する方法^(69,81-83)、種々のコレステロール含量のリポソーム中に酵素や輸送蛋白質などを組み込み再構成したものを用いる方法^(93,94)、等がある。

本章においては *in vitro* で刷子縁膜小胞を水溶性のコレステロールエステルである cholesteryl hemisuccinate (CHS) で処理することによってコレステロール含量を増加させ、膜流動性低下による有機カチオン輸送の変動について精査した。まず、CHS 処理により刷子縁膜中のコレステロール含量が増加し、膜流動性が低下することを確認した。CHS 処理によりコレステロール含量を変化させ、膜流動性を低下させる本手法はその簡便性と確実性のため広く用いられている。Levi ら⁽⁹⁵⁾ もラット腎刷子縁膜を CHS 処理しコレステロール含量が上昇した場合、膜流動性が低下することを報告しており、これは著者の結果と一致する。

次に CHS 処理を行い膜流動性の低下した刷子縁膜小胞への有機カチオン TEA の取り込みを測定したところ、コントロール群と比べ CHS 処理群で TEA 取り込みは増加した。種々の量の CHS で処理を行ったところ、膜中でのコレステロール含量が多く流動性が低いほど TEA 取り込みは大きかった。これらの結果から CHS 処理によってコレステロール含量が増加し、膜流動性が低下するに従って有機カチオン輸送活性は上昇することが明らかとなった。

CHS 処理によって膜中でコレステロールが増加することにより膜小胞の形状が

変化することが考えられる。しかし、平衡状態に達したときの TEA の取り込みに CHS 処理の影響は少なく、本実験に用いた CHS 量では膜小胞の内容積の変化は少ないと考えられる。 H^+ /有機カチオン逆輸送系に高い親和性を有する cimetidine を大量に共存させたときの非特異的な TEA 取り込みへの CHS 処理の影響も小さいものであった。従ってコレステロール含量増加による膜流動性の低下は、 H^+ /有機カチオン逆輸送系に対して影響を与えられられる。本研究では 0.1mg CHS/mg BBMV の量まで CHS 処理を行い、この範囲では有機カチオン輸送活性は処理に用いた CHS 量に比例して上昇した。さらに高用量の CHS で処理を行った場合、有機カチオン輸送活性はそのまま用いた CHS 量に比例し上昇するか、あるいは最適な量がありそれ以上では活性が低下するか興味をもたれる。しかし高用量の CHS を用いて予備的な検討を行ったところ、膜小胞の内容積が増加し輸送活性を正確に評価することができなかったため、それ以上の検討は行わなかった。

第 I 章ではベンジルアルコールにより膜流動性が上昇したとき、駆動力である H^+ 勾配の消失過程と輸送体の両者が影響を受け、有機カチオン輸送活性が低下することを示した。本章では CHS 処理により H^+ 勾配存在下及び非存在下で TEA 取り込みが増加したこと、CHS 処理した刷子縁膜を介する H^+ 勾配の消失速度はコントロール群と比べて遅延することを示した。従って CHS 処理により膜流動性が低下したときも、駆動力である H^+ 勾配の消失過程と輸送体の両者が影響を受け、有機カチオン輸送活性が上昇すると考えられる。

膜流動性低下による Na^+ /glucose 共輸送の変動についても検討を加えた。CHS 処理により Na^+ /glucose 共輸送活性は上昇するが、その程度は有機カチオン輸送とは若干異なるものであり、輸送系によって膜流動性低下の影響は異なることが示唆された。Levi ら⁽⁹⁵⁾ はラット腎刷子縁膜を CHS 処理し膜流動性が低下したとき、 Na^+ /リン酸共輸送系の活性が低下することを報告している。一方、ベンジルアルコール共存により膜流動性が上昇したとき、 Na^+ /リン酸共輸送活性は上昇することが報告されている^(27,51)。これは膜流動性が上昇したとき輸送活性は低下し、流動性が低下したとき輸送活性が上昇する有機カチオン輸送系とはまったく逆の現象である。

Fig. II-11 は各輸送系により最適な膜流動性が異なっていることを模式的に表したものである。ある輸送系 (A) では正常の刷子縁膜の流動性より若干低い流動性で輸送活性が最大となり、そのため流動性が高くなると輸送活性は低下し、逆に流動

性が低くなると輸送活性が高くなる。逆に正常値より若干高い流動性で輸送活性が最大となる輸送系、BではAと逆の現象が観察されるものと推察される。また、Cのような輸送系は流動性が上昇したときはAと比べ輸送活性の低下は少ないが、逆に流動性が低下したときは輸送活性の上昇はAよりも大きいと考えられる。輸送系により膜流動性の影響の受け方が違うことは、それぞれの輸送系の活性が膜脂質環境に支配されており、それぞれに最適な膜脂質環境があると考ええることで説明することができる。

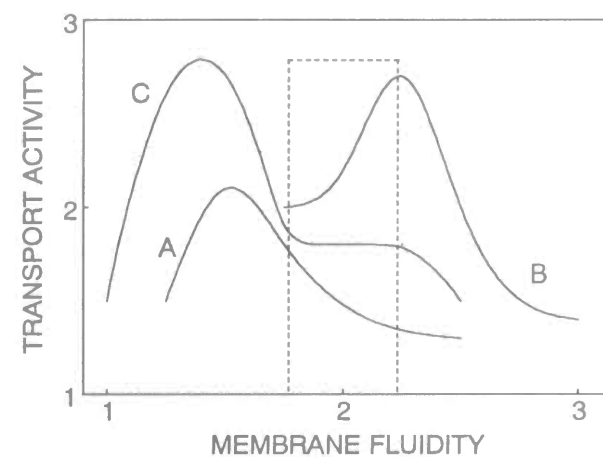


Fig. II-11 Schematic view of relationship between transport activity and membrane fluidity. Open bar represents the physiological fluidity range of brush-border membranes.

第 III 章 膜流動性変化による有機カチオン輸送の調節：発育の影響

第 II 章までの検討から、腎近位尿細管刷子縁膜における有機カチオン輸送は膜流動性変動の影響を受け、流動性の上昇に従い輸送活性は低下すること、逆に流動性低下によって輸送活性は上昇することを明らかにした。従って、膜流動性は腎刷子縁膜の有機カチオン輸送を制御する重要な因子であると考えられる。そこで、次に生理的な条件下において、膜流動性の変動によって有機カチオン輸送が調節されるかどうかについて検討を加えた。

小児は種々の生理機能が未発達であり、薬物の体内動態が成人と比べ大きく異なる。腎機能も新生児においては成人と比べて低く、成長に伴い発達する。従って主として腎を介して排泄される薬物を新生児に用いる場合、薬物の体内からの消失が成人と比べて遅くなり、副作用の発現する可能性が高くなるため、投与量・投与間隔について充分注意する必要がある⁽⁹⁶⁻¹⁰⁰⁾。

新生児における糸球体濾過速度は成人の 20~40%と低いことが知られている^(96,98)。また近位尿細管における栄養物質の再吸収も不十分であり、新生児において観察される glucose 尿やアミノ酸尿は近位尿細管に存在する glucose やアミノ酸の輸送系の活性が低いことに起因するという報告がある⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾。薬物分泌能も発育によって変化すると考えられるが、これまで十分には検討されていない。

成長に伴い細胞膜の性質も変化する。腎及び小腸の刷子縁膜では成長に伴い、膜流動性が低下することが報告されている⁽¹⁰⁵⁻¹¹⁰⁾。Medow ら⁽¹⁰⁶⁾は腎近位尿細管において刷子縁膜流動性が発育により低下し、そのためアミノ酸の再吸収能が上昇すると報告している。有機カチオン輸送も膜流動性変動の影響を受け、膜流動性が高い状態では輸送活性が低く流動性が低下するに従って輸送活性が上昇することから、発育によって刷子縁膜流動性が変化するならば、それによって有機カチオン輸送も変動することが予想される。しかし発育による有機カチオン輸送の変化、並びに成長に伴う膜流動性の変化と有機カチオン輸送の関連について膜レベルで検討した報告は見当たらない。そこで本章では、種々の日齢のラット腎から刷子縁膜小胞を調製し、膜流動性と有機カチオン輸送の変化について考察を加えた。

III-1 刷子縁膜流動性に及ぼす発育の影響

成長に伴い腎重量の増加や糸球体濾過速度の上昇など、多くの形態学的、生理学的な変化が腎臓において起こる。近位尿細管の機能も出生直後では低く、成長に伴い上昇すると考えられる。また近位尿細管刷子縁膜の物理化学的な性質も発育の影響を受け変化すると考えられる。そこでまず、種々の日齢のラットの腎から刷子縁膜小胞を調製することを試み、調製した刷子縁膜の流動性の変化について検討を加えた。

1-a 膜小胞の精製度の検討

生後 14 日目の哺乳ラットの腎重量は約 0.1g であり、極めて小さいため、腎から皮質部を切片として単離することが物理的に困難であった。そこで腎全体を出発材料として第 I、II 章と同様な方法により刷子縁膜小胞を調製した。哺乳ラットで腎全体を用いたため、比較する 8 週齢成熟ラットからも腎全体を用いて膜小胞を調製した。

まず、哺乳ラットから得られた刷子縁膜小胞の精製度について検証した。Table III-1 に腎ホモジネート及び調製した刷子縁膜小胞における酵素活性を測定した結果をまとめた。刷子縁膜の指標酵素であるアルカリ性ホスファターゼ (EC 3.1.3.1.) とアミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.2.) の比活性はホモジネート、刷子縁膜画分ともに成熟ラットと比べて哺乳ラットで低いものであった。しかし、ホモジネートに対する刷子縁膜画分中の酵素活性の上昇率(enrichment)は哺乳ラットにおいても 17 倍以上と大きいことから、得られた刷子縁膜は十分精製されていると考えられる。一方、側底膜の指標酵素である Na⁺/K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3.) の活性は哺乳ラット、成熟ラットの両群で大きな差はなく、また enrichment も 1 以下と小さいものであったことから、側底膜画分の混入は哺乳ラットから得られた刷子縁膜においても極めて少ないと考えられる。これらの結果から、哺乳ラットの腎からも成熟ラットと同様に刷子縁膜小胞が調製されることが確認された。

Table III-1 Specific activities of alkaline phosphatase, aminopeptidase and Na⁺/K⁺-ATPase in the homogenates and brush-border membranes from adult and 14-day-old rats.

	Alkaline phosphatase		Aminopeptidase		Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	
	Adult	14-day-old	Adult	14-day-old	Adult	14-day-old
Homogenate S.A. ^a	42.7 ±2.8	19.9 ±0.6	53.8 ±1.3	16.1 ±0.6	66.4 ±20	53.7 ±12
BBM S.A. ^a	741 ±101	350 ±27	1022 ±71	439 ±15	63.8 ±17	51.7 ±14
Enrichment ^b	17.3 ±1.8	17.6 ±1.6	19 ±1.1	27.4 ±1.2	0.98 ±0.04	0.98 ±0.2

^a Specific activity (S.A.) (nmol/mg protein/min).
^b Enrichment indicates the ratio of the specific activities in the BBM and the homogenates.

1-b 哺乳ラットと成熟ラットの刷子縁膜流動性の比較

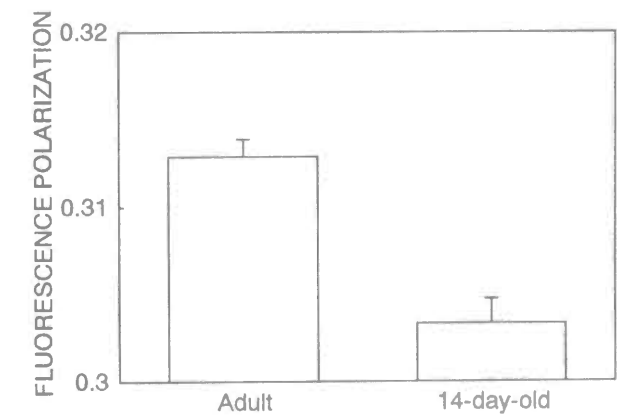


Fig. III-1 Fluidity of brush-border membranes from adult and 14-day-old rats.

次に DPH を用い蛍光偏光解消法により、哺乳ラット及び成熟ラットの刷子縁膜流動性を比較した。Fig. III-1 に 14 日齢哺乳ラット及び 8 週齢成熟ラットから調製した刷子縁膜小胞中での DPH の偏光度を示した。DPH の偏光度は成熟ラットと比べて哺乳ラットから調製した刷子縁膜で小さいことから、哺乳ラットの刷子縁膜の

流動性は成熟ラットと比べ高いことが示された。

III-2 成長に伴う有機カチオン輸送の変化

成人では多くのカチオン性薬物が腎近位尿細管から能動的に分泌されることは古くから知られているが、新生児における薬物分泌に関する検討は少なく、不明な点が多い。新生児の近位尿細管刷子縁膜における有機カチオン輸送系の存在やその輸送特性など、薬物分泌機構について膜レベルでの報告もなされていない。

III-1 節での検討から、哺乳ラットからも成熟ラットと同様に刷子縁膜小胞が調製できること、しかしその膜流動性は成熟ラットからのものと比べて高いことが明らかとなったため、次に両群のラットから調製した刷子縁膜小胞における有機カチオンの輸送特性について検討を加えた。

2-a 哺乳ラットと成熟ラットの有機カチオン輸送特性の比較

Fig. III-2 に小胞内 pH 6.0、小胞外 pH 7.5 とし、H⁺/有機カチオン逆輸送系の駆動力である外向き H⁺勾配存在下での、哺乳ラット及び成熟ラットから調製した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みについて測定した結果を示した。

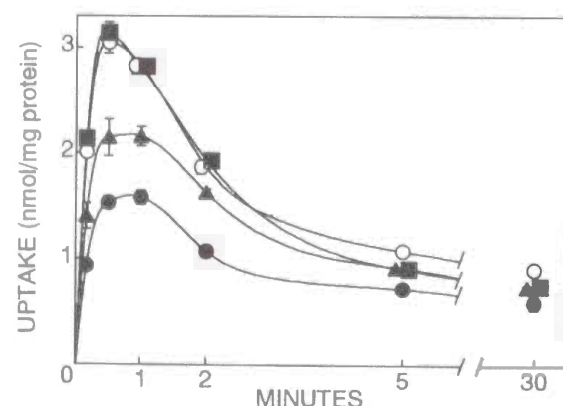


Fig. III-2 TEA uptake by brush-border membrane vesicles from adult and 14-, 21-, and 28-day-old rats (with H⁺ gradient). Membrane vesicles (pH 6.0) from adult (○), 14-day-old (●), 21-day-old (▲) and 28-day-old (■) rats were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [¹⁴C]TEA (final 0.25mM).

成熟ラットから調製した刷子縁膜では H⁺勾配と共役した顕著な一過性の上り坂輸送(overshoot 現象)が認められる。14 日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞においても、TEA 取り込みは H⁺勾配によって促進され、overshoot 現象が観察され

た。しかし、初期取り込み速度及び overshoot のピーク値は成熟ラットから調製した刷子縁膜小胞と比べ低いものであった。成熟ラット及び哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞での 30 分間の TEA 取り込み、すなわち取り込みの平衡値には大きな変化が認められなかったことから、膜小胞の内容積は両群で同程度であると考えられる。

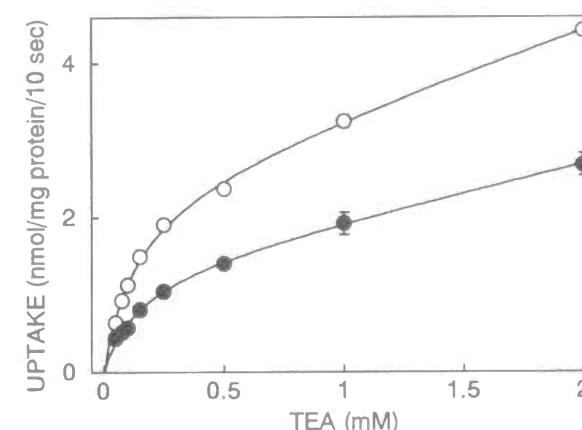


Fig. III-3 Concentration dependence of TEA uptake. Membrane vesicles (pH 6.0) from adult (○) and 14-day-old (●) rats were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing various concentrations of [¹⁴C]TEA.

Fig. III-3 に成熟ラット及び哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みの濃度依存性について検討した結果を示した。TEA の濃度を 0.0625mM から 2mM まで変化させ、外向き H⁺勾配存在下で TEA の初期取り込み速度を測定したところ、両群ともに高濃度で飽和現象が認められた。次式によって非線形最小二乗法で解析を行い、速度論的パラメータを算出した。

$$V = V_{\max}[S]/(K_m + [S]) + K_d[S]$$

V は初期取り込み速度、[S] は基質初濃度、V_{max} は輸送系を介する最大輸送速度、K_m はミカエリス定数、K_d は非特異的な輸送の係数を示す。成熟ラットにおける K_m、V_{max} はそれぞれ、0.14mM、14.6 nmol/mg protein/min であった。哺乳ラットにおいても成熟ラットと同様、単一の輸送系の存在が示唆され、その K_m、V_{max} はそれぞれ、0.13mM、7.01 nmol/mg protein/min であり、成熟ラットと比べ K_m 値は同程度だが、V_{max} 値は低いものであった。従って哺乳ラットでは成熟ラットと比べ、有機カチオン輸送系の基質親和性は同程度であるが、輸送体の活性は低いものと考えられる。また K_d 値は成熟ラット及び哺乳ラットでそれぞれ、6.44、5.08 nmol/mg protein/min/mM とその差は小さく、TEA の非特異的な膜透過性は成熟ラットと哺乳ラットで同程度であることが示された。

成熟ラット及び哺乳ラットにおける有機カチオン輸送系の基質認識性を比較するため、TEA 取り込みに及ぼす種々の有機カチオンの影響について検討した。

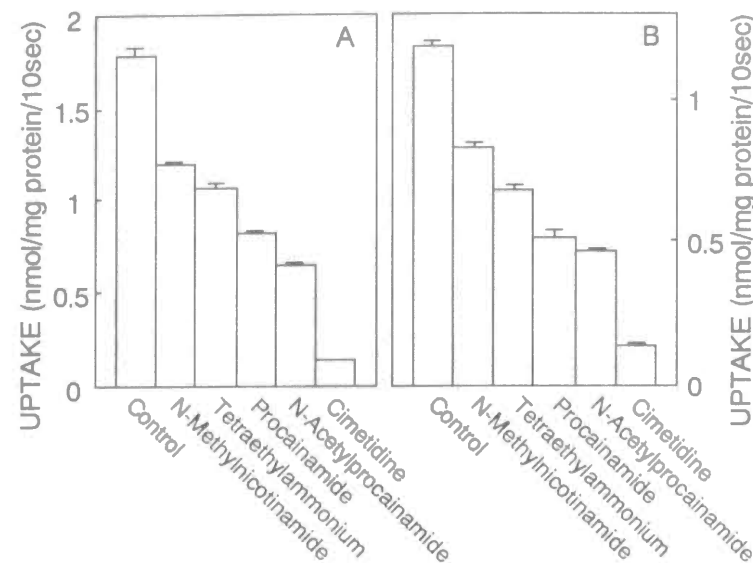


Fig. III-4 **Effect of various organic cations on TEA uptake.** Membrane vesicles (pH 6.0) from adult (A) and 14-day-old (B) rats were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [14 C]TEA (final 0.25mM) and 0.625mM various organic cations (final 0.5mM).

Fig. III-4 に外向き H^+ 勾配存在下、成熟ラット及び哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みに及ぼす種々の有機カチオンの阻害効果を示した。両群とも TEA 取り込みは cimetidine で最も強く阻害され、以下、*N*-acetylprocainamide、procainamide、非標識 TEA、*N*¹-methylnicotinamide の順であった。また、それぞれの有機カチオンによる TEA 取り込み阻害の程度は、成熟ラットと哺乳ラットの両群で同程度であった。従って成熟ラット及び哺乳ラットにおける有機カチオン輸送系の基質認識性は同一であると推察される。

これらの結果から、哺乳ラットの腎刷子縁膜にも成熟ラットと同様の基質認識性、親和性を示す H^+ /有機カチオン逆輸送系が存在すること、しかしその輸送活性は成熟ラットのものと比べて低いことが明らかとなった。

2-b 成長に伴う有機カチオン輸送活性の変化

成長に伴う有機カチオン輸送活性の変化について検討するため、外向き H^+ 勾配存在下、種々の日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞への TEA の取り込みを測定した。

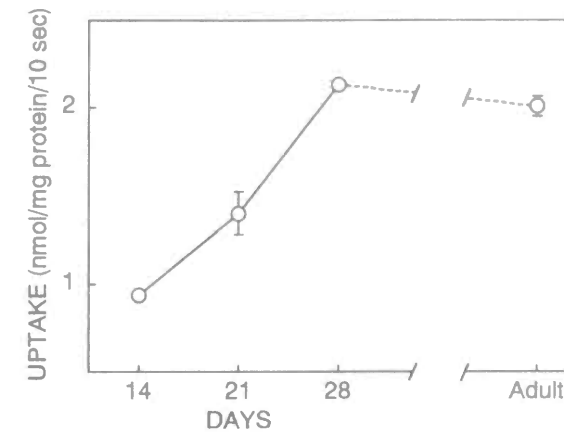


Fig. III-5 **Relationship between age and TEA transport.** Membrane vesicles (pH 6.0) from rats of various ages were incubated with the substrate mixture (pH 7.5) containing 0.3125mM [14 C]TEA (final 0.25mM).

Fig. III-5 にラットの日齢と各群から調製した刷子縁膜小胞への TEA の初期取り込み速度について示した。TEA の初期取り込み速度は 14 日齢では成熟ラットの約 50%であるが、成長に伴い上昇し、28 日齢で成熟ラットの値に達することが明らかとなった。

哺乳ラットにおいて有機カチオン輸送活性が低い原因の一つとして駆動力である H^+ 勾配の消失速度の差が考えられる。そこで成熟ラット及び哺乳ラットの刷子縁膜における H^+ 勾配の消失について、Acridine orange 蛍光消光法を用いて比較検討を行った。その結果、成熟ラットの刷子縁膜を介する H^+ 勾配消失速度は $0.042 \pm 0.002 \text{ sec}^{-1}$ であるのに対し、哺乳ラットでは $0.026 \pm 0.001 \text{ sec}^{-1}$ であり、哺乳ラットの刷子縁膜を介する H^+ 勾配の消失は成熟ラットと比べてむしろ遅いものと考えられた。

Trans-stimulation 効果はある基質がキャリアー輸送される場合に特徴的にみられる現象であり、成熟ラットの刷子縁膜では pH7.5~8.5 のアルカリ性領域において、TEA 同士の直接交換により *trans-stimulation* 効果が起こることが知られている。すなわち、小胞内に非標識の TEA を負荷した場合、小胞外の [14 C]TEA との直接交換が起こり [14 C]TEA の取り込みが促進される⁽⁴⁰⁾。

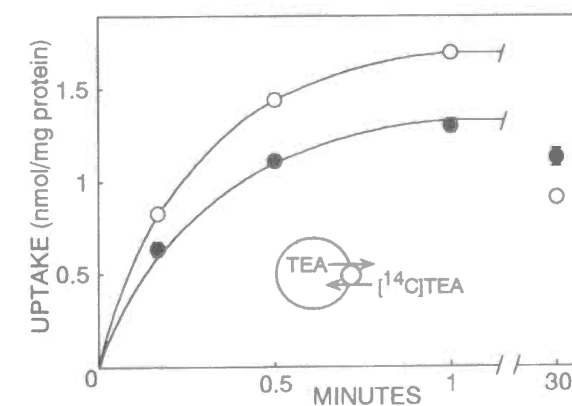


Fig. III-6 **TEA-TEA exchange in brush-border membrane vesicles from adult and 14-day-old rats.** Membrane vesicles (pH 8.0) from adult (○) and 14-day-old (●) rats preloaded with 2.5mM TEA were incubated with the substrate mixture (pH 8.0) containing 0.278mM [14 C]TEA (final 0.25mM).

Fig. III-6 から明らかなように、哺乳ラットにおいても *trans*-stimulation 効果が観察されたが、TEA 取り込みは成熟ラットと比べて低いものであった。従って、哺乳ラットにおいて有機カチオン輸送活性が低いのは駆動力である H^+ 勾配の消失速度の変化によるものではなく、有機カチオン輸送体の活性が成熟ラットと比べて低いためと考えられる。

第 I 章では成熟ラットから調製した刷子縁膜小胞にベンジルアルコールを共存させ膜流動性を上昇させた場合、 H^+ 勾配の消失は促進されることを示した。本章では哺乳ラットから調製した刷子縁膜では成熟ラットのものと比べ膜流動性が高いにもかかわらず、 H^+ 勾配消失はむしろ遅延していた。これは哺乳ラットと成熟ラットにおいて脂質組成が異なっているためと考えられる。哺乳ラットの腎刷子縁膜では成熟ラットと比べ、ホスファチジルセリン及びホスファチジルエタノールアミンの含量が低く、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールの含量は高いことが知られている⁽¹⁰⁷⁾。従って哺乳ラットと成熟ラットでは刷子縁膜脂質の構成が異なるために、 H^+ の透過性の変化がベンジルアルコールを用いたときとは異なると考えられる。

膜流動性の変動が成熟ラットと哺乳ラットにおける有機カチオン輸送活性の違いの一因であることを確認するため、14 日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞を第 II 章と同様に cholesteryl hemisuccinate (0.05mg CHS/mg BBMV) で処理し膜流動性を低下させ、TEA 取り込みを測定した。その結果、外向き H^+ 勾配存在下での TEA の初期取り込み速度は、コントロール群では 1.27 ± 0.05 nmol/mg protein/10sec であったのに対し、CHS 処理群では 1.40 ± 0.05 nmol/mg protein/10sec と上昇した。

また、TEA 取り込みの濃度依存性の検討から、哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞では成熟ラットのものと比べ K_m 値は同程度であるが V_{max} 値が低く (Fig. III-3)、これは成熟ラットから調製した刷子縁膜小胞にベンジルアルコールを共存させ膜流動性を上昇させたときの結果と同じ傾向を示していた (Fig. I-5)。

これらの結果から、哺乳ラットの刷子縁膜では成熟ラットと比べて膜流動性が高いため有機カチオン輸送活性が低く、成長に伴い膜流動性が低下するため有機カチオン輸送活性は上昇するものと推察された。

III-3 考察

小児は成人と比べて体重が異なるだけでなく、種々の生理機能が異なっており、またその機能は発育に伴い変化する。従って小児に対し、単に成人への投与量を体重のみで補正した値を用いたとき、薬物血中濃度が低く効果が不十分であったり、あるいは逆に濃度が高いため副作用が発現しやすいこと等が起るため、小児への薬物療法は成人とは異なったありかたが必要とされる。しかし、小児における薬物動態学的、薬力学的な検討はあまりなされておらず、そのため長らく小児は「Therapeutic Orphan (治療の孤児)」と呼ばれていた⁽⁹⁸⁾。近年になり、小児における薬物動態についての解明が進んできた。

小児における腎機能の検討から、糸球体濾過速度は出生直後では成人の約 20% であり、成長に伴い上昇し 2-4 歳でほぼ 100% に達することが解明されている^(96,98)。尿細管での薬物分泌能については、アニオン性薬物で検討されており、出生直後では分泌能が低く成長に伴い上昇すること、また輸送系の基質となるアニオン性薬物の持続的な投与により分泌能の上昇が促進されることが、*in vivo* 及び摘出単離尿細管、腎皮質切片を用いた方法によって明らかにされている^(111,112)。カチオン性薬物についても、腎皮質切片を用いた検討がなされており、出生直後のイヌの腎では皮質切片への有機カチオンの取り込みは低く成長に伴い上昇すること、しかしその上昇パターンはアニオン性薬物の場合とは異なること、アニオン性薬物とは異なり基質による輸送能上昇の促進効果は認められないことが明らかにされている⁽¹¹³⁾。

腎尿細管における薬物の分泌は血管側側底膜、管腔側刷子縁膜の性質の異なる二つの膜を介する輸送過程の集積であるため、カチオン性薬物の分泌機構の詳細を知るためには、主として側底膜での輸送を反映していると考えられる腎皮質切片を用いる方法だけではなく、刷子縁膜を介する輸送について膜レベルでの検討が必要とされる。そこで、本章では種々の日齢のラットから刷子縁膜小胞を調製し、有機カチオン輸送について検討を行い、さらに輸送活性と膜流動性との関連についても考察を加えた。

成熟ラットと比べ哺乳ラットでは刷子縁が未発達であり、調製された膜小胞の精製度が低い可能性が考えられる。そこでまず、哺乳ラットから調製した膜小胞の性質について検討したところ、刷子縁膜の指標酵素の比活性は腎ホモジネートと比べ、

膜小胞で 17 倍以上と成熟ラットと同様に上昇しており、逆に側底膜の指標酵素の比活性は低く、得られた膜小胞の精製度は十分に高いことが示された。また、哺乳ラットから調製した刷子縁膜の流動性は、成熟ラットと比べ高いものであった。哺乳ラットから調製した刷子縁膜における有機カチオン輸送は、成熟ラットと同様に外向き H^+ 勾配により促進され、overshoot 現象が観察された。また、非標識 TEA を予め膜小胞に負荷しておくことにより小胞外の $[^{14}C]TEA$ の取り込みが上昇する *trans-stimulation* 効果も、哺乳ラットから調製された刷子縁膜で認められた。TEA 取り込みの濃度依存性から求めた K_m 値は哺乳ラット、成熟ラットの両者から調製した膜小胞で同程度であり、また種々の有機カチオンによる TEA 輸送の障害の程度は、哺乳ラットと成熟ラットの両群で同程度のものであった。これらの結果から、哺乳ラットの腎刷子縁膜にも成熟ラットと同様の基質認識性、親和性を示す H^+ /有機カチオン逆輸送系が存在することが示された。しかし、哺乳ラットから得られた刷子縁膜小胞では成熟ラットと比べ、TEA 取り込みの初期速度は低く、取り込みの濃度依存性から求めた V_{max} 値も低いものであった。TEA 取り込みの初期速度は、14 日齢の哺乳ラットでは成熟ラットの約 50% であるが、成長に伴い上昇し、28 日齢で成熟ラットの値に達した。従って哺乳ラットの腎刷子縁膜における H^+ /有機カチオン逆輸送系の活性は低く、成長に伴い上昇することが明らかとなった。

新生児で観察されるアミノ酸尿も成長に伴う近位尿細管におけるアミノ酸の再吸収能の上昇により消失すると考えられている。Medow ら^(103,106)は発育によるアミノ酸の再吸収能の変化について膜小胞系を用いて検討を加えている。彼らは種々の発育段階のラットの腎から刷子縁膜小胞を調製し proline の取り込みを測定したところ、成長に伴い proline の取り込みが上昇することを報告している。また、哺乳ラットの刷子縁膜流動性は成熟ラットのものと比べて高く、成長に伴い低下すること、成長に伴う膜流動性の低下が proline の輸送活性の上昇とよく対応することも示している。

一方、 Na^+ /リン酸共輸送系の活性は哺乳ラットの刷子縁膜で高く、成長に伴い低下することが報告されている^(114,115)。また、成熟ラットから調製した刷子縁膜にベンジルアルコールを添加し膜流動性を上昇させた場合、 Na^+ /リン酸共輸送活性は上昇することも報告されている⁽²⁷⁾。従って Na^+ /リン酸共輸送系は膜流動性が高いときに輸送活性が高いと考えられ、そのため膜流動性が高い哺乳ラットでは輸送活性が高

いが、成長に伴い膜流動性が低下するに従って輸送活性が低下すると推察されている^(114,115)。

刷子縁膜における H^+ /有機カチオン逆輸送系の輸送活性は第 I 章、第 II 章における検討から、膜流動性が高いときに低く、逆に膜流動性が低いときに輸送活性が高いことが明らかにされた。そのため成長に伴う刷子縁膜流動性の低下により輸送活性が調節され、有機カチオン輸送は上昇すると推察できる。しかし膜流動性以外にも多くの点で哺乳ラットと成熟ラットでは違いがあり、成長に伴う有機カチオン輸送活性変化のより詳細な機構については更なる検討が必要と思われる。

結論

以上、著者は三章にわたり膜流動性によるカチオン性薬物の腎輸送制御機構に関する研究を行い、次のような結論を得た。

第 I 章 刷子縁膜の流動性上昇による有機カチオン輸送の変動

膜流動性上昇が有機カチオン輸送活性に及ぼす影響について解明するため、膜流動化作用を持つアルコール類を用い、刷子縁膜及び側底膜小胞における tetraethylammonium (TEA) 輸送の変動について検討を行った。ベンジルアルコールにより、刷子縁膜及び側底膜中の 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) の偏光度は低下し、膜流動性が上昇することが確認された。刷子縁膜小胞への TEA の取り込みはベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害され、その IC_{50} は 18.3mM であった。ブタノール、ヘキサノール、オクタノールのいずれの場合も濃度依存的な TEA 輸送阻害が観察され、その強さはオクタノール、ヘキサノール、ブタノールの順であった。また、刷子縁膜中の DPH の偏光度と TEA の取り込みには良い相関が認められた。一方、側底膜小胞への TEA 取り込みはベンジルアルコールの影響を受けなかった。これらの結果から、刷子縁膜においては、膜流動性が上昇するに従って有機カチオン輸送活性が低下することが明らかとなった。

刷子縁膜小胞への choline 及び glucose の取り込みもベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害され、その IC_{50} はそれぞれ 37.4mM、24.3mM であった。ベンジルアルコールによる輸送阻害効果の強さは、有機カチオン輸送系、glucose 輸送系、choline 輸送系の順であり、これら輸送系の中では有機カチオン輸送系が膜流動性上昇の影響を最も受けやすいことが示唆された。

第 II 章 刷子縁膜の流動性低下による有機カチオン輸送の変動

コレステロールは生体膜を構成する重要な成分であり、膜流動性の決定に大きな役割を果たしている。コレステロールのエステル体である cholesteryl hemisuccinate (CHS) を含む緩衝液中で刷子縁膜小胞を 37℃ で 1 時間インキュベートしたところ、

刷子縁膜中のコレステロール含量は増加し、これに伴い DPH の偏光度の上昇、すなわち膜流動性の低下が観察された。種々の用量の CHS で処理した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みを測定したところ、用量依存的に TEA 取り込みは増加した。TEA 取り込みと CHS 処理した刷子縁膜中の DPH の偏光度とは良い相関が認められた。これらの結果から、刷子縁膜の流動性の低下に伴い、有機カチオン輸送活性が上昇することが明らかとなった。

第 III 章 膜流動性変化による有機カチオン輸送の調節：発育の影響

薬物分泌能と発育の関連性について解析するため、哺乳ラット及び成熟ラットの腎から調製した刷子縁膜小胞を用い、両群における有機カチオン輸送及び膜流動性について比較検討を行った。生後 14 日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜中の DPH の偏光度は成熟ラットからのものと比べて低く、哺乳ラットの刷子縁膜流動性は成熟ラットよりも高いことが示された。14 日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞においても、TEA の取り込みは駆動力である逆向き H^+ 勾配と共役した一過性の上り坂輸送 (overshoot 現象) が観察され、また基質認識性も成熟ラットからのものと同一であった。しかし TEA 取り込みの初期速度は成熟ラットと比べ 14 日齢の哺乳ラットでは低く、有機カチオン輸送活性は低いことが示された。輸送活性は成長に伴い上昇し、28 日齢で成熟ラットの値に達した。これらの結果から、哺乳ラットの腎刷子縁膜中に成熟ラットと同様の性質を持つ有機カチオン輸送系が存在すること、しかしその輸送活性は成熟ラットと比べて低く成長に伴い上昇すること、膜流動性の低下が輸送活性上昇の一因であることが明らかとなった。

以上、著者は腎皮質から単離した刷子縁膜小胞を用いて膜流動性変動による有機カチオン輸送活性の制御について検討を行い、膜流動性の上昇によって輸送活性が低下すること、逆に膜流動性の低下によって輸送活性が上昇すること、成長に伴う膜流動性の低下が輸送活性上昇の要因の一つであることを明らかにした。これらの研究結果は腎尿細管上皮細胞を介したイオン性薬物輸送の生理的、病態生理的な輸送変化について解明を進める上で有用な基礎的知見となり得るものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 乾 賢一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を戴いた、京都大学 堀 了平名誉教授、広島大学 高野幹久教授に深謝致します。さらに、種々の有益な御助言を戴いた京都大学医学部附属病院薬剤部の教室員一同に深く感謝致します。

実験の部

第 I 章 実験の部

[I-1] 試薬

[^{14}C]tetraethylammonium (0.19GBq/mmol)、*p*-[^{14}C]aminohippurate (1.5-1.6GBq/mmol) は Du Pont-New England Nuclear 社のもの、[^3H]choline (3.18TBq/mmol)、[^3H]D-glucose (222GBq/mmol)、[^{14}C] α -ketoglutarate (2.1Gbq/mmol) は Amersham International 社のもの、Percoll (密度 1.129g/ml) は Pharmacia 社のもの、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Molecular Probes 社のもの、carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) は Fluka AG、Acridine orange は Merck 社のもの、ベンジルアルコール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、tetraethylammonium、cimetidine、tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (Mes) はナカライテスク社のもの、その他の試薬は市販特級品を用いた。

[I-2] 刷子縁膜小胞の調製

Ohoka ら⁽¹¹⁶⁾の方法に従って調製した。

体重 200-230g の Wistar 系雄性ラット(7-8 匹)を pentobarbital (40mg/kg)で麻酔後開腹し、両腎をすばやく摘出し、氷冷調製用緩衝液 A (300mM mannitol, 5mM EGTA, 12mM Tris-HCl, pH 7.1)で洗浄し血液を除く。以下の操作はすべて 4℃で行う。被膜を除去した後、Stadie-Riggs microtome で厚さ約 0.3mm の腎皮質切片を作成する。腎皮質切片の湿重量を測定し、9 倍用の調製用緩衝液 A を加え Waring blender (日本精機)で 2 分間、18000rpm でホモジナイズする。純水で 2 倍希釈し、 MgCl_2 を 10mM となるように加え、15 分間穏やかに攪拌した後、1900g で 15 分間遠心分離する (沈殿 1 除去)。上清を 24000g で 30 分間遠心し (上清 2 除去)、沈殿に 10 倍用の 1/2 調製用緩衝液 A (150mM mannitol, 2.5mM EGTA, 6mM Tris-HCl, pH 7.1)を加えて glass/Teflon Potter ホモジナイザーで 1000rpm、10 回ホモジナイズする。再度、 MgCl_2 を 10mM となるように加え、15 分間穏やかに攪拌した後、1900g で 15 分間遠心分離する (沈殿 3 除去)。上清を 24000g で 30 分間遠心し (上清 4 除去)、沈殿に 20 倍

用の取り込み実験用緩衝液 A (100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) または取り込み実験用緩衝液 B (100mM mannitol, 10mM Mes-KOH, pH 6.0) を加えて glass/Teflon Potter ホモジナイザーで 1000rpm、10 回ホモジナイズし、24000g で 30 分間遠心分離する (上清 5 除去)。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 A または B を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm) をつけたプラスチックシリンジで懸濁し、刷子縁膜画分として用いた。

[I-3] 側底膜小胞の調製

Inui ら⁽¹⁷⁾の方法に従って調製した。

体重 200-230g の Wistar 系雄性ラット (15 匹) を pentobarbital (40mg/kg) で麻酔後開腹し、両腎をすばやく摘出し、氷冷調製用緩衝液 B (250mM sucrose, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.5) で洗浄し血液を除く。以下の操作はすべて 4℃で行う。被膜を除去した後、Stadie-Riggs microtome で厚さ約 0.3mm の腎皮質切片を作成する。腎皮質切片の湿重量を測定し、5 倍用の調製用緩衝液 B を加え Dounce ホモジナイザー (Wheaton 社、Type B) でホモジナイズする。ホモジネートを遠心し、2400g に達し次第停止させ、上清を採取する。この操作をさらに 2 回繰り返した後 (沈殿 1-3 除去)、上清を 2400g で 15 分間遠心分離する。上清と沈殿上層部 (下層部; 沈殿 4 除去) を混和し 20500g で 20 分間遠心分離する (上清 5 除去)。沈殿上層部 (下層部; 沈殿 6 除去) を調製用緩衝液 B に懸濁し、glass/Teflon Potter ホモジナイザーで 1000rpm、10 回ホモジナイズし、粗膜画分とする。粗膜画分に Percoll を 10%(v/v) となるように加え、48000g で 30 分間遠心分離した後、全量 30ml の上清から 8ml (fraction 1)、5ml (fraction 2、側底膜画分) を密度勾配フラクショネーター (日立製作所、DGF-U) で分取する。Fraction 2 を調製用緩衝液 B で希釈し、Percoll を除去するために 100000g で 120 分間遠心分離する (上清 8 除去)。沈殿に取り込み用緩衝液 A を加えて glass/Teflon Potter ホモジナイザーで 1000rpm、10 回ホモジナイズし、100000g で 60 分間遠心分離する (上清 9 除去)。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 A を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm) をつけたプラスチックシリンジで懸濁し、側底膜画分として用いた。

[I-4] 膜流動性の測定

膜流動性は定常状態での膜中の DPH の蛍光偏光度により評価した^(32,33,61)。DPH は tetrahydrofuran に 2mM となるように溶解し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で 2000 倍に希釈する。希釈後、スターラーを用いて 2 時間以上攪拌し、tetrahydrofuran を揮発させる。刷子縁膜小胞 (300μg protein) を加え、DPH (最終濃度 1μM) と 37℃、30 分間インキュベートする。偏光板を装着した蛍光光度計 (島津製作所、RF-5000) を用い、25℃で励起波長 360nm、蛍光波長 430nm として DPH の蛍光を測定する。励起光側偏光板の角度が x、蛍光側偏光板の角度が y の時の蛍光強度を $I_{x,y}$ と表すと、膜中での DPH の蛍光偏光度(P)は次式で計算される。

$$P = (I_{0,0} - G \cdot I_{90,0}) / (I_{0,0} + G \cdot I_{90,0}) \quad (G = I_{90,0} / I_{0,90})$$

[I-5] 取り込み実験法

取り込み実験は膜小胞を調製した当日に迅速濾過法により行った。

例として外向き H⁺勾配存在下での刷子縁膜小胞への TEA の取り込み実験の方法について示す。取り込み実験用緩衝液 B に懸濁した刷子縁膜小胞に同じ緩衝液に溶解した KCl を加え、KCl 濃度を 100mM として 25℃、1 時間放置し平衡化する。膜小胞懸濁液 20μl に 0.3125mM [¹⁴C]TEA を含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 80μl を加え、25℃で一定時間インキュベートする。所定時間の後、氷冷した反応停止液 (150mM KCl, 0.1mM HgCl₂, 20mM HEPES-Tris, pH 7.5) 1ml を加えて反応を停止させ、直ちに Millipore filter (Type HAWP, pore size 0.45μm, 直径 2.5cm) で吸引濾過し、さらに氷冷反応停止液 5ml で洗浄する。各 filter に補集された放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、膜小胞内への取り込み量を算出した。これとは別に膜小胞懸濁液 20μl に氷冷反応停止液 1ml を加えた後に基質溶液を加え、直ちに吸引濾過、洗浄して測定した値を非特異的な吸着量として補正を行った。

(a) Tetraethylammonium の取り込み

H⁺勾配非存在下での刷子縁膜小胞への TEA の取り込みは、100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した膜小胞 20μl へ、2mM [¹⁴C]TEA を含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 20μl を

加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

側底膜小胞への TEA の取り込みは、100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH 緩衝液(pH 7.5)に懸濁した側底膜小胞 20 μ l へ、0.25mM [14 C]TEA を含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 20 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

(b) *Trans*-stimulation 効果

100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH 緩衝液(pH 8.0)に懸濁した刷子縁膜小胞に 2.5mM の非標識 TEA を 25 $^{\circ}$ C で 1 時間負荷したもの 20 μ l に、0.278mM [14 C]TEA を含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 8.0) 180 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

(c) ベンジルアルコールの効果の可逆性

ベンジルアルコール処理群は取り込み実験用緩衝液 B に懸濁した刷子縁膜小胞にベンジルアルコールを 20mM となるように加え、25 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートする。その後、40 倍量の氷冷取り込み実験用緩衝液 B を加え、24000g で 30 分間遠心分離する。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 B を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm)をつけたプラスチックシリンジで懸濁し、さらに 40 倍量の実験用緩衝液 B を加え 24000g で 30 分間遠心分離する。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 B を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm)をつけたプラスチックシリンジで懸濁したものをを用いて、取り込み実験を行った。コントロール群はベンジルアルコールを含まない緩衝液を用いて同様に操作を行った。

(d) Choline の取り込み

小胞内負の膜電位を形成させた条件での choline 取り込みは、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁し、100mM K gluconate を負荷した刷子縁膜小胞 20 μ l へ、55.6 μ M [3 H]choline を含む基質溶液 (100mM Na gluconate, 100mM mannitol, 7 μ M valinomycin, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 180 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

膜電位が存在しない状態での取り込みは、基質溶液中の Na gluconate を K

gluconate に変え、膜小胞内外の K $^{+}$ 勾配を一定として行った。

(e) Glucose の取り込み

内向き Na $^{+}$ 勾配存在下での glucose の取り込みは、300mM mannitol, 10mM HEPES-KOH 緩衝液(pH 7.5)に懸濁した刷子縁膜小胞 20 μ l へ、0.1mM [3 H]D-glucose を含む基質溶液 (200mM NaCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 20 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。反応停止液として 150mM NaCl, 20mM HEPES-Tris (pH 7.5)を用いた。

Na $^{+}$ 勾配非存在下での glucose の取り込みは、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁し、100mM NaCl を負荷した刷子縁膜小胞 20 μ l へ、0.1mM [3 H]D-glucose を含む基質溶液 (100mM NaCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 20 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

(f) *p*-Aminohippurate の取り込み

内向き Na $^{+}$ 勾配存在下での側底膜小胞への *p*-aminohippurate (PAH)の取り込みは、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁し、100mM KCl を負荷した側底膜小胞 20 μ l へ、0.11mM [14 C]PAH を含む基質溶液 (100mM NaCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 180 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

外向きジカルボン酸勾配存在下での PAH の取り込みは、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁し、2.5mM glutarate 及び 100mM KCl を負荷した側底膜小胞 20 μ l へ、0.11mM [14 C]PAH を含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 180 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

(g) α -Ketoglutarate の取り込み

内向き Na $^{+}$ 勾配存在下での側底膜小胞への α -ketoglutarate の取り込みは、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁した側底膜小胞 20 μ l へ、0.2mM [14 C] α -ketoglutarate を含む基質溶液 (100mM NaCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 20 μ l を加えてインキュベートし、取り込み量を算出した。

[I-6] H⁺勾配測定法

膜小胞内外の H⁺勾配の測定は、Acridine orange を用いた蛍光消光法により測定した^(35-37,40)。取り込み実験用緩衝液 B(pH 6.0)に懸濁した刷子縁膜小胞 50μl (300μg protein)を 6μM Acridine orange を含む 3ml の緩衝液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5)に希釈する。蛍光光度計 (島津製作所、RF-5000)を用い、25℃で励起波長 493nm、蛍光波長 530nm として Acridine orange の蛍光変化を連続的に記録した。

[I-7] 蛋白質定量法

γ-globulin を標準物質とし、Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて Bradford 法⁽¹¹⁸⁾により定量した。

第 II 章 実験の部

[II-1] 試薬

Cholesteryl hemisuccinate (CHS)及び牛血清アルブミン (BSA)は Sigma 社のもの、polyvinylpyrrolidone (PVP)はナカライテスク社のものを用いた。

[II-2] 刷子縁膜小胞のコレステロール処理

第 I 章実験の部 [I-2] に記載した方法で調製し、取り込み実験用緩衝液 A に懸濁した刷子縁膜小胞をエタノールに溶解した所定量の CHS 及び 3.5% PVP、1% BSA を含む PBS 中に加え、攪拌しながら 37℃で 1 時間インキュベートする。氷冷した取り込み実験用緩衝液 A 又は B を加えて反応を停止し、24000g で 30 分間遠心分離する。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 A 又は B を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm)をつけたプラスチックシリンジで懸濁し、さらに 40 倍量の取り込み用緩衝液を加え 24000g で 30 分間遠心分離する。得られた沈殿に取り込み実験用緩衝液 A 又は B を少量加え、注射針 (0.4 x 19 mm)をつけたプラスチックシリンジで懸濁したものを CHS 処理した膜小胞とした。

(a) コレステロール含量の測定

コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業)を用いて、コレステロールエステラーゼ・コレステロールオキシダーゼ法により測定した⁽¹¹⁹⁾。

[II-3] 取り込み実験法

第 I 章実験の部 [I-5] に記載した方法により行った。

第 III 章 実験の部

[III-1] 試薬

Procainamide、*N*-acetylprocainamide は Sigma 社のもの、*N*¹-methylnicotinamide は Aldrich 社のものを用いた。

[III-2] 刷子縁膜小胞の調製

Wistar 系哺乳ラット、14 日齢(体重 18-23g)、21 日齢(体重 35-40g)、28 日齢(体重 60-70g)各 20 匹又は成熟ラット 8 週齢(体重 240-260g)5 匹を pentobarbital (40mg/kg)で麻酔後開腹し、両腎をすばやく摘出し、氷冷調製用緩衝液 A で洗浄し血液を除く。被膜を除去した後、腎湿重量を測定し、9 倍用の調製用緩衝液 A を加え Waring blender で 2 分間、18000rpm でホモジナイズする。以降の操作は第 I 章実験の部[I-2]に記載した方法により行い、刷子縁膜小胞を調製した。

[III-3] 刷子縁膜、側底膜指標酵素活性の測定

(a) アルカリ性ホスファターゼ (EC 3.1.3.1.)

18mM *p*-nitrophenyl phosphate を含む 0.5ml の基質溶液に 100μl の試料を加え、37℃で 15 分間インキュベートする。0.6N の NaOH 溶液 2.5ml を加えて反応を停止した後、3000rpm で 10 分間遠心分離し、上清の 410nm における吸光度を測定した。

(b) アミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.2.)

1.5mM leucine *p*-nitroanilide を含む基質溶液 2ml に 100μl の試料を加え、37℃、15 分間インキュベートする。5% ZnSO₄ 2.5ml を加えて反応を停止した後、3000rpm で 10 分間遠心分離し、上清の 400nm における吸光度を測定した。

(c) Na⁺/K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3.)

3mM ATP を含む基質溶液 1ml に 100μl の試料を加え、37℃で 15 分間インキュベートする。50% trichloroacetic acid 0.1ml を加えて反応を停止した後、1ml の蒸留水を加え、3000rpm で 10 分間遠心分離する。上清 1ml に 3ml の molybdate-H₂SO₄ と 0.1ml

の Fiske-Subbarow 試薬を加え 25℃で 20 分間放置した後、660nm における吸光度を測定する。ouabain 非存在下の値から ouabain 存在下での値を差し引き、Na⁺/K⁺-ATPase 活性を算出した。

[III-4] 取り込み実験法

第 I 章実験の部 [I-5] に記載した方法により行った。

(a) cis-inhibition 効果

刷子縁膜小胞への TEA 取り込みに及ぼす各種有機カチオンの影響は、100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM Mes-KOH 緩衝液(pH 6.0)に懸濁した膜小胞 20μl へ、0.3125mM [¹⁴C]TEA 及び 0.625mM の有機カチオンを含む基質溶液 (100mM KCl, 100mM mannitol, 10mM HEPES-KOH, pH 7.5) 80μl を加えてインキュベートし、[¹⁴C]TEA の取り込み量を算出した。

論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

Modulation of organic cation transport and lipid fluidity by benzyl alcohol in rat renal brush-border membranes.

Pharmaceutical Research **13**: 1069-1072, 1996.

Effects of benzyl alcohol on organic ion transport in rat renal basolateral membranes.

Pharmaceutical Sciences **2**: 415-417, 1996.

Cholesterol modulates organic cation transport activity and lipid fluidity in rat renal brush-border membranes.

Biochimica et Biophysica Acta **1283**: 232-236, 1996.

Developmental maturation of organic cation transport in rat renal brush-border membranes.

Pharmaceutical Sciences **2**: 423-425, 1996.

引用文献

1. B.R.Rennick. Renal tubular transport of organic cations. *Am. J. Physiol.* **240**: F83-F89 (1981)
2. 乾 賢一. 小腸及び腎尿細管上皮細胞膜における薬物輸送機構に関する研究. *薬学雑誌* **108**: 921-937 (1988)
3. K.Inui, M.Takano and R.Hori. Organic cation transport in the renal brush-border and basolateral membranes. In M.Hatano (ed.) *Nephrology*. Springer-Verlag. pp.1391-1398 (1991)
4. 高野幹久. 薬物の生体膜輸送. *膜* **17**: 142-152 (1992)
5. 高野幹久. 腎尿細管上皮細胞における薬物輸送機構の解析. *薬物動態* **10**: 556-565 (1995)
6. J.B.Pritchard and D.S.Miller. Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol. Rev.* **73**: 765-796 (1993)
7. D.Gründemann, V.Gorboulev, S.Gambaryan, M.Veyhl and H.Koeppel. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**: 549-552 (1994)
8. S.J.Singer and G.L.Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731 (1972)
9. 野澤義則, 大木和夫. "生体膜のバイオダイナミクス" 羊土社 (1993)
10. H.Lodish, D.Baltimore, A.Berk, S.L.Zipursky, P.Matsudaira and J.Darnell. Membrane structure: the plasma membrane. In *Molecular Cell Biology*. 3rd.Ed., W.H.Freeman, pp.595-632 (1995)
11. C.D.Stubbs and A.D.Smith. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **779**: 89-137 (1984)
12. A.A.Spector and M.A.Yorek. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* **26**: 1015-1035 (1985)
13. B.Deuticke and C.W.M.Haest. Lipid modulation of transport proteins in vertebrate cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* **49**: 221-235 (1987)
14. P.L.Yeagle. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* **3**: 1833-1842 (1989)
15. C.Le Grimellec, G.Friedlander, E.H.El Yandouzi, P.Zlatkine and M.C.Giocondi. Membrane fluidity and transport properties in epithelia. *Kidney Int.* **42**: 825-836 (1992)
16. 北河修治. 膜作用性薬物の血小板機能修飾機構に関する生物物理化学的研究.

17. H.Murer and R.Kinne. The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes. *J. Membrane Biol.* **55**: 81-95 (1980)
18. R.K.H.Kinne. Selectivity and direction: plasma membranes in renal transport. *Am. J. Physiol.* **260**: F153-F162 (1991)
19. 乾 賢一. 小腸及び腎尿細管上皮細胞膜. 日本膜学会編, 膜学実験シリーズ第I巻生体膜編, 共立出版, pp.86-90 (1994)
20. R.J.Alpern, D.K.Stone and F.C.Rector,Jr. Renal acidification mechanisms. In B.M.Brenner and F.C.Rector,Jr. (eds.) *The Kidney*, 4th Edn., W.B.Saunders, Vol.1, pp. 318-379. (1991)
21. S.Mitjavila, C.Lacombe and G.Carrera. Changes in activity in rat brush border enzymes incubated with a homologous series of aliphatic alcohols. *Biochem. Pharmacol.* **25**: 625-630 (1976)
22. M.K.Jain, J.Gleeson, A.Upreti and G.C.Upreti. Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **509**: 1-8 (1978)
23. L.M.Gordon, R.D.Sauerheber, J.A.Esgate, I.Dipple, R.J.Marchmont and M.D.Houslay. The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J. Biol. Chem.* **255**: 4519-4527 (1980)
24. L.G.Tillotson, E.A.Carter, K.Inui and K.J.Isselbacher. Inhibition of Na⁺-stimulated glucose transport function and perturbation of intestinal microvillus membrane vesicles by ethanol and acetaldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**: 360-370 (1981)
25. Y.J.Fernandez, R.M.Boigegrain, C.D.Cambon-Gros and S.E.Mitjavila. Sensitivity of Na⁺-coupled D-glucose uptake, Mg²⁺-ATPase and sucrase to perturbations of the fluidity of brush-border membrane vesicles induced by n-aliphatic alcohols. *Biochim. Biophys. Acta.* **770**: 171-177 (1984)
26. B.Carrière and C.Le Grimellec. Effects of benzyl alcohol on enzyme activities and D-glucose transport in kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **857**: 131-138 (1986)
27. A.N.K.Yusufi, M.Szczepanska-Konkel, A.Hoppe and T.P.Dousa. Different mechanisms of adaptive increase in Na⁺-Pi cotransport across renal brush-border membrane. *Am. J. Physiol.* **256**: F852-F861 (1989)
28. J.B.Meddings, D.DeSouza, M.Goel and S.Thiesen. Glucose transport and microvillus membrane physical properties along the crypt-villus axis of the rabbit. *J. Clin. Invest.* **85**: 1099-1107 (1990)

29. P.Parenti, B.Giordana and G.M.Hanozet. In vitro effect of ethanol on sodium and glucose transport in rabbit renal brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 92-98 (1991)
30. F.A.Sinicrope, P.K.Dudeja, B.M.Bissonnette, A.R.Safa and T.A.Brasitus. Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **267**: 24995-25002 (1992)
31. S.Kitagawa, Y.Sugaya, M.Nishizawa and H.Hirata. Relationship of alcohol-induced changes in Mg²⁺-ATPase activity of rabbit intestinal brush border membrane with changes in fluidity of its lipid bilayer. *J. Membrane Biol.* **146**: 193-199 (1995)
32. M.Shinitzky and Y.Barenholz. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* **515**: 367-394 (1978)
33. W.J.Van Blitterswijk, R.P.Van Hoeven and B.W.Van der Meer. Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **644**: 323-332 (1981)
34. C.M.Colley and J.C.Metcalf. The localization of small molecules in lipid bilayer. *FEBS Lett.* **24**: 241-246 (1972)
35. W.W.Reensta, D.G.Warnock, V.J.Yee and J.G.Forte. Proton gradients in renal cortex brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **256**: 11663-11666 (1981)
36. D.E.Cohn, S.Klahr and M.R.Hammerman. Metabolic acidosis and parathyroidectomy increase Na⁺-H⁺ exchange in brush border vesicles. *Am. J. Physiol.* **245**: F217-F222 (1983)
37. J.Kinsella, T.Cujdik and B.Sacktor. Na⁺-H⁺ exchange activity in renal brush border membrane vesicles in response to metabolic acidosis: the role of glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 630-634 (1983)
38. H.E.Ives and A.S.Verkmán. Effects of membrane fluidizing agents on renal brush border proton permeability. *Am. J. Physiol.* **249**: F933-F940 (1985)
39. J.M.Wilkes, H.J.Ballard, D.T.F.Dryden and B.H.Hirst. Proton permeability and lipid dynamics of gastric and duodenal apical membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **256**: G553-G562 (1989)
40. T.Katsura, H.Maegawa, Y.Tomita, M.Takano, K.Inui and R.Hori. Trans-stimulation effect on H⁺-organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* **261**: F774-F778 (1991)
41. C.Hansch and W.J.Dunn,III. Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *J. Pharm. Sci.* **61**: 1-19 (1972)
42. S.H.Wright, T.M.Wunz and T.P.Wunz. A choline transporter in renal brush-border

- membrane vesicles: energetics and structural specificity. *J. Membrane Biol.* **126**: 51-65 (1992)
43. M.Takano, T.Katsura, Y.Tomita, M.Yasuhara and R.Hori. Transport mechanism of choline in rat renal brush-border membrane. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 889-894 (1993)
 44. E.M.Wright. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 575-589 (1993)
 45. M.A.Hediger and D.B.Rhoads. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* **74**: 993-1026 (1994)
 46. S.H.Zeisel, K.da Costa, P.D.Franklin, E.A.Alexander, J.T.LaMont, N.F.Sheard and A.Beiser. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J.* **5**: 2093-2098 (1991)
 47. M.Acara, F.Roch-Ramel and B.Rennick. Bidirectional renal tubular transport of free choline: a micropuncture study. *Am. J. Physiol.* **236**: F112-F118 (1979)
 48. K.Besseghir, L.B.Pearce and B.Rennick. Renal tubular transport and metabolism of organic cations by the rabbit. *Am. J. Physiol.* **241**: F308-F314 (1981)
 49. M.A.Hediger, M.J.Coady, T.S.Ikeda and E.M.Wright. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330**: 379-381 (1987)
 50. M.G.Martin, E.Turk, M.Pilar Lostao, C.Kerner and E.M.Wright. Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nature Genet.* **12**: 216-220 (1996)
 51. G.Friedlander, M.Shahedi, C.Le Grimellec and C.Amiel. Increase in membrane fluidity and opening of tight junctions have similar effects on sodium-coupled uptakes in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 11183-11188 (1988)
 52. G.Friedlander, C.Le Grimellec and C.Amiel. Increase in membrane fluidity modulates sodium-coupled uptakes and cyclic AMP synthesis by renal proximal tubular cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1022**: 1-7 (1990)
 53. K.Simons and G.van Meer. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202 (1988)
 54. W.J.Nelson. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* **258**: 948-955 (1992)
 55. K.Matter and I.Mellman. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 545-554 (1994)
 56. C.Le Grimellec, M-C.Giocondi, B.Carrière, S.Carrière and J.Cardinal. Membrane fluidity and enzyme activities in brush border and basolateral membranes of the dog kidney. *Am. J. Physiol.* **242**: F246-F253 (1982)
 57. C.Le Grimellec, S.Carrière, J.Cardinal and M-C.Giocondi. Fluidity of brush border and basolateral membranes from human kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **245**: F227-F231 (1983)
 58. M.K.Hise, W.W.Mantulin and E.J.Weinman. Fluidity and composition of brush border and basolateral membranes from rat kidney. *Am. J. Physiol.* **247**: F434-F439 (1984)
 59. B.A.Molitoris and F.R.Simon. Renal cortical brush-border and basolateral membranes: cholesterol and phospholipid composition and relative turnover. *J. Membrane Biol.* **83**: 207-215 (1985)
 60. B.A.Molitoris and C.Hoilien. Static and dynamic components of renal cortical brush border and basolateral membrane fluidity: role of cholesterol. *J. Membrane Biol.* **99**: 165-172 (1987)
 61. N.P.Illsley, H.Y.Lin and A.S.Verkman. Lipid-phase structure in epithelial cell membranes: comparison of renal brush border and basolateral membranes. *Biochemistry* **27**: 2077-2083 (1988)
 62. R.Hori, M.Takano, T.Okano and K.Inui. Transport of *p*-aminohippurate, tetraethylammonium and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**: 776-781 (1985)
 63. K.Inui, M.Takano, H.Maegawa, M.Kato and R.Hori. Decreased transport of *p*-aminohippurate in renal basolateral membranes isolated from rats with acute renal failure. *Pharm. Res.* **6**: 954-957 (1989)
 64. J.V.Moller and M.I.Sheikh. Renal organic anion transport system: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* **34**: 315-385 (1983)
 65. H.Shimada, B.Moewes and G.Burckhardt. Indirect coupling of *p*-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **253**: F795-F801 (1987)
 66. J.B.Pritchard. Coupled transport of *p*-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **255**: F597-F604 (1988)
 67. Y.K.Kim, S.H.Lee, J.M.Goldinger and S.K.Hong. Effect of ethanol on organic ion transport in rabbit kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**: 411-420 (1986)
 68. B.A.Molitoris, P.D.Wilson, R.W.Schrier and F.R.Simon. Ischemia induces partial loss of surface membrane polarity and accumulation of putative calcium ionophores. *J. Clin. Invest.* **76**: 2097-2105 (1985)
 69. B.A.Molitoris and R.Kinne. Ischemia induces surface membrane dysfunction. Mechanism of altered Na⁺-dependent glucose transport. *J. Clin. Invest.* **80**: 647-654 (1987)
 70. B.A.Molitoris, S.A.Falk and R.H.Dahl. Ischemia-induced loss of epithelial polarity.

Role of the tight junction. *J. Clin. Invest.* **84**: 1334-1339 (1989)

71. B.A.Molitoris. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* **260**: F769-F778 (1991)
72. E.M.Fish and B.A.Molitoris. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1580-1588 (1994)
73. S.Maeda, M.Takano, T.Okano, K.Ohoka, K.Inui and R.Hori. Transport of organic cation in renal brush-border membrane from rats with renal ischemic injury. *Biochim. Biophys. Acta* **1150**: 103-110 (1993)
74. J.P.Fillastre and G.Raguenez-Viotte. Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **46**: 163-175 (1989)
75. V.Pinzani, F.Bressolle, I.J.Haug, M.Galtier, J.P.Blayac and P.Balmès. Cisplatin-induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**: 1-9 (1994)
76. A.Halabe, N.L.M.Wong and R.A.L.Sutton. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. *Nephron* **57**: 197-200 (1991)
77. M.Yanase, O.Uyama, T.Nakanishi, N.Shiratsuki and M.Sugita. Decreased sodium dependent D-glucose transport across renal brush-border membranes in cis-diamminedichloride platinum induced acute renal failure. *Renal Failure* **14**: 23-30 (1992)
78. F.Courjault-Gautier, C.Le Grimellec, M-C.Giocondi and H.J.Toutain. Modulation of sodium-coupled uptake and membrane fluidity by cisplatin in renal proximal tubular cells in primary culture and brush-border membrane vesicles. *Kidney Int.* **47**: 1048-1056 (1995)
79. G.van Meer and K.Simons. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* **5**: 1455-1464 (1986)
80. B.Gumbiner. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am. J. Physiol.* **253**: C749-C758 (1987)
81. B.A.Molitoris, A.C.Alfrey, R.A.Harris and F.R.Simon. Renal apical membrane cholesterol and fluidity in regulation of phosphate transport. *Am. J. Physiol.* **249**: F12-F19 (1985)
82. S.Kawata, A.Chitranukroh, J.S.Owen and N.McIntyre. Membrane lipid changes in erythrocytes, liver and kidney in acute and chronic experimental liver disease in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **896**: 26-34 (1987)

83. Y.Imai, J.E.Scoble, N.McIntyre and J.S.Owen. Increased Na⁺-dependent D-glucose transport and altered lipid composition in renal cortical brush-border membrane vesicles from bile duct-ligated rats. *J. Lipid Res.* **33**: 473-483 (1992)
84. J.Vanderkooi, S.Fischkoff, B.Chance and R.A.Cooper. Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. *Biochemistry* **13**: 1589-1595 (1974)
85. P.L.Yeagle. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **822**: 267-287 (1985)
86. W.J.van Blitterswijk, B.W.van der Meer and H.Hilkmann. Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* **26**: 1746-1756 (1987)
87. M.Shinitzky, Y.Skornick and N.Haran-Ghera. Effective tumor immunization induced by cells of elevated membrane-lipid microviscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5313-5316 (1979)
88. D.S.Heron, M.Shinitzky, M.Hershkowitz and D.Samuel. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 7463-7467 (1980)
89. I.Yuli, W.Wilbrandt and M.Shinitzky. Glucose transport through cell membranes of modified lipid fluidity. *Biochemistry* **20**: 4250-4256 (1981)
90. E.R.Block and D.Edwards. Effect of plasma membrane fluidity on serotonin transport by endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **253**: C672-C678 (1987)
91. T.A.Brasitus, R.Dahiya, P.K.Dudeja and B.M.Bissonnette. Cholesterol modulates alkaline phosphatase activity of rat intestinal microvillus membranes. *J. Biol. Chem.* **263**: 8592-8597 (1988)
92. P.L.Yeagle, J.Young and D.Rice. Effects of cholesterol on (Na⁺, K⁺)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* **27**: 6449-6452 (1988)
93. I.Ducis and H.Koepsell. A simple liposomal system to reconstitute and assay highly efficient Na⁺/D-glucose cotransport from kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **730**: 119-129 (1983)
94. T.Saeki, A.M.Shimabuku, K.Ueda and T.Komano. Specific drug binding by purified lipid-reconstituted P-glycoprotein: dependence on the lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**: 105-110 (1992)
95. M.Levi, B.M.Baird and P.V.Wilson. Cholesterol modulates rat renal brush-border membrane phosphate transport. *J. Clin. Invest.* **85**: 231-237 (1990)

96. J.B.Hook and M.D.Bailie. Perinatal renal pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**: 491-509 (1979)
97. E.Gladtko. The importance of pharmacokinetics for paediatrics. *Eur. J. Pediatr.* **131**: 85-91 (1979)
98. R.L.Milsap and S.J.Szefer. Special pharmacokinetic considerations in children. In W.E.Evans, J.J.Schentag and W.J.Jusko (eds) *Applied Pharmacokinetics*, 2nd Ed., *Applied Therapeutics*, pp.294-330 (1986)
99. 佐藤温重. 腎排泄機構の発現. 野々村禎昭, 小幡邦彦編, 新生理科学大系 7 発生・分化の生理学, 医学書院, pp.170-179 (1991)
100. 高田寛治. 小児における薬物動態. 薬物動態学, 薬業時報社, pp.315-320 (1995)
101. G.J.Schwartz and A.P.Evan. Development of solute transport in rabbit proximal tubule. I. HCO_3^- and glucose absorption. *Am. J. Physiol.* **245**: F382-F390 (1983)
102. R.W.Chesney, N.Gusowski, I.Zeilkovic and M.Padilla. Developmental aspects of renal β -amino acid transport. V: brush border membrane transport in nursing animals - effect of age and diet. *Pediatr. Res.* **20**: 890-894 (1986)
103. M.S.Medow, K.S.Roth, D.R.Goldmann, K.Ginkinger, B.Y.L.Hsu and S.Segal. Developmental aspects of proline transport in rat renal brush border membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7561-7564 (1986)
104. J.C.Beck, M.S.Lipkowitz and R.G.Abramson. Characterization of the fetal glucose transporter in rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* **82**: 379-387 (1988)
105. M.K.Hise and E.J.Weinman. Physical properties of the rat renal brush border membrane during growth. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **406**: 234-236 (1986)
106. M.S.Medow and S.Segal. Age related changes in fluidity of rat renal brushborder membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **142**: 849-856 (1987)
107. R.W.Chesney, N.Gusowski and I.Zelikovic. Developmental aspects of renal β -amino acid transport. VI. The role of membrane fluidity and phospholipid composition in the renal adaptive response in nursing animals. *Pediatr. Res.* **22**: 163-167 (1987).
108. J.E.Heubi and J.L.Fellows. Postnatal development of intestinal bile salt transport. Relationship to membrane physico-chemical changes. *J. Lipid Res.* **26**: 797-805 (1985)
109. S.M.Schwarz, B.Hostetler, S.Ling, M.Mone and J.B.Watkins. Intestinal membrane lipid composition and fluidity during development in the rat. *Am. J. Physiol.* **248**: G200-G207 (1985)
110. C.Hübner, S.G.Lindner, M.Stern, M.Claussen and A.Kohlschütter. Membrane fluidity and lipid composition of rat small intestinal brush-border membranes during postnatal maturation. *Biochim. Biophys. Acta* **939**: 145-150 (1988)
111. G.H.Hirsch and J.B.Hook. Maturation of renal organic acid transport: substrate stimulation by penicillin. *Science* **165**: 909-910 (1969)
112. J.T.Bond, M.D.Bailie and J.B.Hook. Maturation of renal organic acid transport *in vivo*: substrate stimulation by penicillin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **199**: 25-31 (1976)
113. B.Rennick, B.Hamilton and R.Evans. Development of renal tubular transports of TEA and PAH in the puppy and piglet. *Am. J. Physiol.* **201**: 743-746 (1961).
114. R.E.Neiberger, M.Barac-Nieto and A.Spitzer. Renal reabsorption of phosphate during development: transport kinetics in BBMV. *Am. J. Physiol.* **257**: F268-F274 (1989).
115. M.Arar, M.Levi and M.Baum. Maturation effects of glucocorticoids on neonatal brush-border membrane phosphate transport. *Pediatr. Res.* **35**: 474-478 (1994)
116. K.Ohoka, M.Takano, T.Okano, S.Maeda, K.Inui and R.Hori. *p*-Aminohippurate transport in rat renal brush-border membranes: a potential-sensitive transport system and an anion exchanger. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 395-401 (1993)
117. K.Inui, T.Okano, M.Takano, S.Kitazawa and R.Hori. A simple method for the isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex. Enzyme activities and some properties of glucose transport. *Biochim. Biophys. Acta* **647**: 150-154 (1981)
118. M.M.Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254 (1976)
119. C.C.Allain, L.S.Poon, C.S.G.Chan, W.Richmond and P.C.Fu. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475 (1974)